

Aus der Abteilung Neurologie
(Prof. Dr. med. M. Bähr)
im Zentrum Neurologische Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Funktionelle Charakterisierung einer neuen Proteininteraktion
zwischen Parkin und BAG1**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Julia Schünemann
aus
Braunschweig

Göttingen
2012

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Kermer

II. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. M. Müller

III. Berichterstatter: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juni 2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1-17
1.1 Die Parkinson-Erkrankung	1
1.1.1 Einführung.....	1
1.1.2 Ätiologie und Pathogenese.....	2
1.1.2.1 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress.....	2
1.1.2.2 Proteinaggregation und proteasomale Dysfunktion.....	3
1.1.2.3 Risikofaktoren und Umwelteinflüsse.....	4
1.1.3 Familiäre Formen von Morbus Parkinson und genetische Risikofaktoren.....	5
1.2 Parkin.....	6
1.2.1 Klinische Erscheinung der Parkin-assoziierten Parkinson-Erkrankung...	6
1.2.2 Zellbiologische und molekulare Charakteristika.....	6
1.2.3 Physiologische Funktion.....	8
1.2.3.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System.....	8
1.2.3.2 Unterschiedliche Arten der Ubiquitinylierung.....	10
1.2.4 Interagierende Proteine und Substrate.....	11
1.3 BAG1.....	14
1.3.1 Physiologische Funktion von BAG1 und seine Interaktionspartner.....	14
1.4 Fragestellung der Arbeit.....	17
 2 Material und Methoden.....	 18-39
2.1 Klonierung.....	18
2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	18
2.1.2 Verwendete Primer.....	19
2.1.3 Aufreinigung des PCR-Produktes.....	20
2.1.4 Restriktionsenzymverdau.....	20
2.1.5 Agarosegel-Elektrophorese.....	21
2.1.6 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen.....	22
2.1.7 Ligation.....	22
2.1.8 Plasmide.....	23
2.1.9 Sequenzierung.....	23
2.1.10 Messung der DNA-Konzentration.....	24

2.2 Amplifizierung der Plasmide.....	24
2.2.1 Transformation kompetenter Zellen.....	24
2.2.2 Mini-Präparation.....	24
2.2.3 Maxi-Präparation.....	25
2.2.4 Anlegen eines Glycerol-Stocks.....	26
2.3 Zelllinien.....	26
2.3.1 HEK293-Zellen.....	26
2.3.2 CSM14.1-Zellen.....	26
2.3.3 SH-SY5Y-Zellen.....	27
2.4 Zellkultur.....	27
2.4.1 Kultivierung.....	27
2.4.2 Passagierung.....	27
2.4.3 Quantifizierung der Zellen.....	28
2.4.4 Einfrieren der Zellen.....	28
2.4.5 Auftauen der Zellen.....	28
2.4.6 Transfektion.....	29
2.5 Proteinanalyse.....	29
2.5.1 Herstellung von zellulären Lysaten mit Triton-X-100.....	29
2.5.2 Herstellung von zellulären Lysaten mit Harnstoff.....	30
2.5.3 Subzelluläre Fraktionierung.....	30
2.5.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA.....	31
2.5.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE).....	31
2.5.6 Western Blot.....	32
2.5.7 Immunodetektion der Proteine.....	33
2.5.8 Coomassie-Färbung.....	33
2.5.9 Dot Blot.....	33
2.6 Antikörper.....	35
2.6.1 Primär-Antikörper.....	35

2.6.2 Sekundär-Antikörper.....	35
2.7 Immunozytochemie.....	36
2.7.1 Auszählung der Parkin-Aggregate.....	37
2.8 Co-Immunopräzipitation (Co-IP).....	37
2.8.1 FLAG-Co-IP.....	37
2.8.2 HA-Co-IP.....	38
2.9 Quantifizierung des Proteinumsatzes.....	39
2.9.1 Cycloheximid-Experimente.....	39
2.9.2 Proteasom-Inhibitor MG 132.....	39
3 Ergebnisse.....	40-58
3.1 Nachweis der Interaktion zwischen Parkin und BAG1.....	40
3.1.1 Co-Immunopräzipitation von Parkin und BAG1 in HEK293-Zellen.....	40
3.1.2 Immunozytochemie von Parkin und BAG1 in CSM14.1-Zellen.....	42
3.2 Kartierung der interagierenden Domäne unter Verwendung verschiedener Parkin-Deletionsmutanten.....	45
3.2.1 Parkin-Deletionsmutations-Konstrukte.....	45
3.2.2 Restriktionsenzymverdau der Parkin-Deletionsmutanten.....	46
3.2.3 Sequenzierung der Parkin-Deletionsmutanten	46
3.2.4 Überexpression der Deletionsmutanten in HEK293- und CSM14.1- Zellen.....	46
3.2.5 Kartierungsexperimente unter Verwendung der Parkin-Deletions- mutanten und BAG1.....	47
3.3 Funktionelle Untersuchung der E3-Ligase-Funktion von Parkin.....	49
3.3.1 Degradationszeitreihen unter Verwendung von Cycloheximid als Translations-Inhibitor.....	49

3.3.2 Die Parkin-vermittelte Ubiquitinylierung des Substratproteins	
CDCrel-1	50
3.4 Der Einfluss von BAG1 auf die Lokalisation und Löslichkeit von	
Parkin.....	53
3.4.1 Untersuchung zur subzellulären Lokalisation von Parkin.....	53
3.4.2 Untersuchungen zur Löslichkeit und Ubiquitinylierung von Parkin.....	55
4 Diskussion.....	59-66
4.1 Identifikation von BAG1 als neuem Parkin-Interaktor.....	59
4.2 Beurteilung der Kartierungsexperimente zur Identifikation der	
interagierenden Parkin-Domäne.....	61
4.3 BAG1 inhibiert die E3-Ligase-Funktion von Parkin.....	62
4.4 BAG1 führt zu einer verstärkten Ubiquitinylierung und Akkumulation	
von Parkin.....	63
4.5 Ausblick.....	66
5 Zusammenfassung.....	67-68
5.1 Deutsch.....	67
5.2 Englisch.....	68
6 Literaturverzeichnis.....	69-78
7 Veröffentlichung zum Thema der Dissertation.....	79

A	Ampere
Abb.	Abbildung
AD	Autosomal dominant
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AR	Autosomal rezessiv
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BAG	<i>Bcl-2-associated athanogene</i>
BCA	Bicinchonin-Säure
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
Bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CASK	<i>Ca²⁺-calmodulin-dependent serine protein kinase</i>
CDCrel	<i>Cell division control related protein</i>
CHIP	<i>Carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein</i>
Co-IP	Co-Immunopräzipitation
Cy3	Indokarcocyanin 3
DA	Dopamin
DAPI	<i>4',6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride</i>
d.h.	das heißt
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced Chemoluminescence</i>
EGFP	<i>Enhanced green fluorescent protein</i>
FBS	fötales Rinderserum (<i>fetal bovine serum</i>)
FCS gold	fötales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
ff	und folgende
FLAG	Oktapeptid, als Signalpeptid verwendet
g	Gramm
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
HA	Hämagglutinin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEK293- Zellen	<i>Human embryonic kidney 293-Zellen</i>

HRP	Meerrettich-Peroxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
Hsp	Hitzeschockprotein
IBR	<i>In-between</i> RING
kDa	Kilodalton
L-Dopa	Levo-Dopa
LRRK2	<i>Leucine-Rich-Repeat kinase 2</i>
Luminol	3-Aminophthalhydrazid
LV	Leervektor (Plasmid ohne Insert)
m	Milli
MAPT	<i>Microtubule-associated protein tau</i>
µg	Mikrogramm
MG 132	Carboxybenzoyl-L-Leucyl-L-Leucyl-L-Leucinal
min	Minute
µl	Mikroliter
MP	Morbus Parkinson
MPTP	1-Methyl-4-phenyl-tetrahydropyridin
MPP ⁺	1-Methyl-4-phenyl-pyridin
Pael-R	<i>Parkin-associated endothelin-like receptor</i>
PBS	Phosphatgepufferte physiologische Kochsalzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PD	<i>Parkinson's disease</i>
PDI	Protein-Disulfid-Isomerase
PFA	Paraformaldehyd
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PINK1	<i>PTEN-induced kinase 1</i>
Raf-1	<i>rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma-1</i>
RING	<i>Really interesting new gene</i>
RIPA	<i>Radioimmunoprecipitation assay</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies (<i>Reactive oxygen species</i>)
Rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg (in Verbindung mit Proteinkomplexen verwendete Einheit)
s.	siehe
SDS	Sodiumdodecylsulfat

SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese
sec	Sekunde
SNpc	Substantia nigra pars compacta
Std	Stunde
Tab.	Tabelle
tag	kurze, einem Protein angefügte Aminosäuresequenz
TBS	<i>Tris buffered saline solution</i>
TBS-T	<i>Tris buffered saline solution with Tween</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Trizma Base (Trishydroxymethyl-)aminomethan
U	<i>Unit</i>
Ubc	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme</i>
UbcH	<i>Ubiquitin-conjugating human enzyme</i>
UBL	<i>Ubiquitin-like</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
V	Volt
VL	Volllänge
wt	Wildtyp

Chemische Elemente wurden mit den definierten Buchstaben abgekürzt. Aminosäuren wurden im Einbuchstabencode angegeben. Gewichts- und andere Einheiten wurden nach dem internationalen SI-System benannt.

Bei einigen Bezeichnungen wurden die englischen Fachtermini benutzt, weil in der deutschsprachigen Fachliteratur eine Übersetzung dieser Begriffe unüblich und unzureichend ist.

Abb. 1.1.....	7
Abb. 1.2.....	7
Abb. 1.3.....	9
Abb. 1.4.....	9
Abb. 1.5.....	10
Abb. 1.6.....	12
Abb. 1.7.....	15
Abb. 3.1.....	40
Abb. 3.2.....	41
Abb. 3.3.....	42
Abb. 3.4.....	43
Abb. 3.5.....	44
Abb. 3.6.....	45
Abb. 3.7.....	46
Abb. 3.8.....	47
Abb. 3.9.....	48
Abb. 3.10.....	50
Abb. 3.11.....	52
Abb. 3.12.....	54
Abb. 3.13.....	55
Abb. 3.14.....	56
Abb. 3.15.....	57
Abb. 3.16.....	58

Tab. 1.1.....	5
Tab. 1.2.....	11
Tab. 1.3.....	12
Tab. 1.4.....	13
Tab. 1.5.....	16
Tab. 2.1.....	23
Tab. 2.2.....	35
Tab. 2.3.....	35

1 Einleitung

1.1 Die Parkinson-Erkrankung

1.1.1 Einführung

Der Morbus Parkinson (MP) ist eine der häufigsten Bewegungsstörungen und nach dem Morbus Alzheimer die zweithäufigste neurodegenerative Erkrankung (Giasson und Lee 2001).

In seiner Monographie „*Essay on the Shaking Palsy*“ (Abhandlung über die Schüttellähmung) beschrieb der englische Arzt James Parkinson 1817 erstmalig die Paralysis agitans oder Schüttellähmung als klinisch definiertes Krankheitsbild. Ruhetremor, Brady- oder Akinese und Rigor sind die drei Kardinalsymptome des Morbus Parkinson (Parkinson 2002). Neben der klassischen Symptom-Trias schränken auch nicht-motorische Symptome, wie kognitive Defizite, Schlafstörungen, Veränderungen der Sensorik und des autonomen Nervensystems (Cheon et al. 2009) die Lebensqualität der Patienten ein und verringern deren Lebenserwartung (Chaudhuri et al. 2006). 20-40% der Parkinson-Patienten erkranken im Verlauf an einer Demenz (Bosboom et al. 2004).

Neuropathologisch zeigt sich unter anderem ein selektiver Verlust von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra, pars compacta (SNpc), der für die klinisch imponierende Bewegungsstörung verantwortlich ist (Dauer und Przedborski 2003, Spillantini et al. 1998). Bei Symptombeginn sind regelhaft bereits 60-70% der Nervenzellen degeneriert (Lang und Lozano 1998 a). Neben dem Verlust dopaminergener Neurone in der SNpc gehen auch in zahlreichen anderen Hirnregionen, wie in cholinergen (Nucleus basalis Meynert, Nucleus dorsalis vagi), noradrenergen (Locus coeruleus) oder serotonergen Systemen (Raphe-Kerne), der Amygdala, dem Cortex und auch im autonomen Nervensystem Zellen zugrunde (Bosboom et al. 2004, Damier et al. 1999, Dauer und Przedborski 2003). Dieser Zelluntergang ist verantwortlich für die zahlreichen nicht-motorischen Symptome.

Charakteristisch für die Histopathologie des MP sind des Weiteren sogenannte Lewy-Körper, die sich in betroffenen Hirnarealen finden lassen (Spillantini et al. 1998). Es handelt sich um zytoplasmatische Einschlüsse, die zahlreiche Proteine, wie etwa α -Synuclein, Neurofilamente, Ubiquitin, Hitzeschockproteine und Parkin enthalten (Schlossmacher et al. 2002).

Klinisch in Erscheinung tritt die Erkrankung durchschnittlich zwischen dem 55. und 65. Lebensjahr (Weintraub et al. 2008). Sowohl die Prävalenz als auch die Inzidenz steigen mit dem Alter an. So liegt die Prävalenz bei den über 65-Jährigen bei ca. 1% (Biasini et al. 2004). Im Vergleich dazu bei den über 85-Jährigen schon bei 4-5% (Giasson und Lee 2001).

Der Morbus Parkinson ist bis heute eine unheilbare progressiv fortschreitende Erkrankung. Dennoch kann die Behandlung der Symptome eine erhebliche Verbesserung der Lebensqualität für die Patienten bedeuten (Lang und Lozano 1998 b).

Therapeutisch wird versucht, den Mangel an Dopamin (DA) und die dadurch entstandene Dysbalance der Neurotransmitter medikamentös auszugleichen. Grundlegend für die Therapie ist daher die Gabe von L-Dopa, die Vorstufe des Dopamins. Des Weiteren kommen auch Monoaminoxidase-B- und Catechol-O-Methyltransferase-Inhibitoren, Dopaminrezeptor-agonisten und Acetylcholinrezeptorantagonisten zum Einsatz (Karow und Lang-Roth 2010). Neben der medikamentösen Therapie steht die tiefe Hirnstimulation, bei der Elektroden in die Basalganglien eingebracht werden, als operative Therapie zur Verfügung (Volkman 2004). Zunehmend wird auch die Möglichkeiten der Stammzell- und Gentherapie erforscht.

Als Ursachen für den Morbus Parkinson kommen sowohl Umwelteinflüsse, als auch Gene oder eine Kombination von Beiden in Betracht (Hancock et al. 2008, Langston 1998). Die Entdeckung von zahlreichen Genen, die mit seltenen familiären Formen des Morbus Parkinson in Verbindung gebracht werden, hat die Rolle der Genetik in der Entstehung von MP bekräftigt (Lesage und Brice 2009). Die genetische Ursachenforschung ermöglicht einen Weg, die pathologischen Mechanismen, die zur Krankheitsentstehung beitragen, zu verstehen und mögliche Angriffspunkte für künftige neuroprotektive Therapien zu finden.

1.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Ca. 95% aller Parkinson-Syndrome treten sporadisch bzw. idiopathisch auf. Nur bei 5% der Patienten mit MP liegt eine vererbte hereditäre Form mit autosomal dominantem (AD) oder rezessivem (AR) Erbgang vor (Dauer und Przedborski 2003).

Die Ursache für den idiopathischen Morbus Parkinson ist bis heute noch weitgehend unbekannt. Als Faktoren, die zu einer Neurodegeneration bei MP führen können, werden vor allem mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress, sowie Proteinaggregation und eine Fehlfunktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems (UPS) diskutiert (Lang und Lozano 1998 a).

1.1.2.1 Mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress

Neben der Regulation von Zellüberleben und programmiertem Zelltod (Apoptose) produzieren Mitochondrien den Energielieferant Adenosintriphosphat (ATP). Bei der Oxidation von beispielsweise Fettsäuren entstehen starke Oxidanzien, sogenannte reaktive Sauerstoffspezies (*Reactive oxygen species*, ROS), wie etwa Wasserstoffperoxid (H₂O₂), als

Nebenprodukt. Sie können Ursache für DNA-Mutationen, oxidative Veränderungen und Inaktivierung von Proteinen oder Lipiden sein und über eine Veränderung der mitochondrialen Membranpermeabilität zum Zelltod führen. Über antioxidative Systeme wie etwa Glutathion können die ROS neutralisiert werden. Dopaminerge Neurone sind besonders anfällig für ROS, da beim Metabolismus von DA zusätzlich H_2O_2 entstehen (Hald und Lotharius 2005). Des Weiteren entstehen bei der Autooxidation toxische Dopamin-Chinone, die mit Cystein-Resten von Proteinen reagieren und sie somit schädigen können (Hald und Lotharius 2005). Bei einer Erhöhung des oxidativen Stresses kann die Anzahl von fehlgefalteten Proteinen die Kapazität der zellulären Abbauege übersteigen.

Zahlreiche Studien liefern Evidenz für erhöhten oxidativen Stress bei MP. Bei Patienten mit der Parkinson-Erkrankung konnte eine erniedrigte Aktivität des Komplexes 1 der Atmungskette (Greenamyre et al. 2001) und Verminderung von Glutathion (Sian et al. 1994) beobachtet werden.

Tiermodelle der Parkinson-Erkrankung bekräftigen die Bedeutung der Mitochondrien bei der Pathogenese. So kann die systemische Verabreichung einiger Neurotoxine, wie MPTP (1-Methyl-4-phenyl-tetrahydropyridin), Rotenon, Paraquat und MPP^+ (1-Methyl-4-phenyl-pyridin), den aktiven Metabolit von MPTP, Symptome des Morbus Parkinson auslösen und zur selektiven Degeneration der Neurone in der SNpc bei Menschen und Tieren führen (Burns et al. 1983, Davis et al. 1979). MPP^+ und auch Rotenon inhibiert den Komplex 1 in den Mitochondrien (Nicklas et al. 1987). Auch einige Proteine, die für hereditäre Formen des Morbus Parkinson verantwortlich sind, sind entweder mitochondriale Proteine oder mit den Mitochondrien assoziiert und bzw. in deren Metabolismus involviert (Lin TK et al. 2009). So ist etwa PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) eine mitochondriale Kinase und mit der inneren mitochondrialen Membran assoziiert (Gandhi et al. 2006, Valente et al. 2004). Auch Parkin kann mit der äußeren Membran des Mitochondriums assoziiert sein (Lin TK et al. 2009, Nuytemans et al. 2010).

1.1.2.2 Proteinaggregation und proteasomale Dysfunktion

Proteinaggregate sind typisch für viele neurodegenerative Erkrankungen. Beim MP treten diese in Form von Lewy-Körpern auf. Die Beobachtung, dass Proteinaggregate bei fast allen neurodegenerative Erkrankungen auftreten, lässt vermuten, dass sie toxisch für Neurone sind (Dauer und Przedborski 2003). Es mehren sich jedoch auch Hinweise, dass Lewy-Körper neuroprotektives Potential haben. Lösliche, fehlgefaltete und oligomerisierte Proteine sind toxisch für die Zelle und können direkt das Proteasom hemmen (Bence et al. 2001). Durch die

Bildung von unlöslichen Lewy-Körpern könnte dieser Effekt minimiert werden (Ciechanover und Brundin 2003).

Proteine, die mit dem erblichen MP in Verbindung gebracht werden und Teil des UPS sind, wie etwa Parkin, verdeutlichen die Bedeutung dieses Systems für die Pathogenese. Das UPS stellt einen der wichtigen Mechanismen zum Abbau mutierter, fehlgefalteter und beschädigter Proteine dar (Lim et al. 2007) (s. Kap. 1.2.3.1). Interessanterweise wurden jedoch bei Patienten mit Mutationen im Parkin-Gen keine Lewy-Körper gefunden (Davie 2008). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Lewy-Körper keine Rolle beim Voranschreiten des pathologischen Prozesses spielen und dass die Ubiquitinylierung von Proteinen wichtig für die Aggregation, Präzipitation und Formierung von diesen sind (Ciechanover und Brundin 2003).

Auch oxidativer Stress könnte eine bedeutende Rolle bei einer Dysfunktion des UPS spielen. Oxidativer Stress führt zu einer Funktionsstörung der Mitochondrien und durch die Reduktion des Energielieferanten ATP zur Störung des ATP-abhängigen Proteasoms. Es entsteht ein Circulus vitiosus: Der verminderte Abbau fehlgefalteter Proteine führt zur Steigerung der ROS und diese wiederum hemmen die Bildung von ATP durch die Dysfunktion der Mitochondrien (Mizuno et al. 2008).

Daneben könnte auch eine Sequestrierung von Bestandteilen des UPS die Dysfunktion des Proteasoms erklären. Die Arbeitsgruppe um McNaught fand eine signifikant verminderte proteasomale Aktivität in der SNpc bei Patienten mit MP (McNaught et al. 2003).

1.1.2.3 Risikofaktoren und Umwelteinflüsse

Das Alter ist bisher der einzige eindeutig identifizierte Risikofaktor (Langston 1998). In einigen Studien wird auch die Bedeutung von Umweltfaktoren für die Entstehung von MP diskutiert. So fand die Arbeitsgruppe um Hernán für Raucher ein um 60% und für Kaffeetrinker ein um 30% erniedrigtes Erkrankungsrisiko im Vergleich zu Nicht-Rauchern und Nicht-Kaffeetrinkern (Hernán et al. 2002). Eine befriedigende Erklärung für den vermeintlich schützenden Effekt wurde jedoch noch nicht gefunden. Ein langjähriger Umgang mit Pestiziden dagegen erhöht das Risiko, an MP zu erkranken (Hancock et al. 2008).

Auch ein inflammatorischer Prozess als mögliche Ursache für den nigrostriatalen Zelluntergang wurde bereits postuliert (Herrera et al. 2005).

1.1.3 Familiäre Formen von Morbus Parkinson und genetische Risikofaktoren

In den letzten Jahrzehnten wurden zahlreiche monogenetische Ursachen und Suszeptibilitäts-Gene für den MP entdeckt. Diese krankheitsassoziierten Gene haben durch Tier- und Zellkulturmodelle einen Einblick in pathophysiologische Bedingungen des MP gegeben. Zu diesen Genen gehören unter anderem α -Synuclein, Parkin, PINK1, DJ-1 und *Leucin-rich repeat kinase 2* (LRRK2). Tabelle 1.1 zeigt eine wachsende Liste Parkinson-assoziiierter Genloci und Vererbungsformen.

Nicht nur Mutationen in den unten genannten Genen, sondern auch bestimmte genetische Variationen können die Penetranz, das Alter zu Beginn, die Schwere und die Progression der Erkrankung beeinflussen (Lesage und Brice 2009). Bestimmte Variationen, sogenannte *Single nucleotide polymorphism*, im α -Synuclein-, *Microtubule-associated protein tau*- (MAPT) und LRRK2-Gen, gehen mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit einher, an Parkinson zu erkranken (Simón-Sánchez et al. 2009).

PARK Locus	Gen	Chrom. Lokalisation	Parkinson Form
PARK 1	α -Synuclein	4q21	EO-MP AD und sporadisch
PARK 2	Parkin	6q25-q27	juveniler und EO-MP AR und sporadisch
PARK 3*	unbekannt	2p13	LO-MP AD
PARK 4	α -Synuclein	4p15	EO-MP AD und sporadisch
PARK 5*	UCH-L1	4p14	LO-MP AD
PARK 6	PINK 1	1p35-p36	EO-MP AR
PARK 7	DJ-1	1p36	EO-MP AR
PARK 8	LRRK2	12q12	LO-MP AD und sporadisch
PARK 9	ATPI3A2	1p36	juveniler AR
PARK 10*	unbekannt	1p32	unbekannt
PARK 11?*	GIGYF2	2q36-q37	LO-MP AD
PARK 12*	unbekannt	Xq	unbekannt
PARK 13*	Omi/HTRA2	2p13	unbekannt
PARK 14?*	PLA2G6	22q13.1	juveniler AR
PARK 15?*	FBX07	22q12-q13	EO AR

Tab. 1.1: Parkinson assoziierte Genloci (modifiziert nach Lesage und Brice 2009 S. 53, Xiromerisiou et al. 2010, S. 2). * Relevanz bis heute noch unklar; EO= *Early Onset*, GIGYF2= *GRB10-interacting GYF protein 2*, Omi/HTRA2: *Omi /High temperature regulation A serine peptidase2*, LO= *Late Onset*, PLA2G6= *Group VI phospholipase A2*, UCH-L1= *Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase*

1.2 Parkin

Parkin wurde als Ursache für den autosomal rezessiv vererbten juvenilen MP erstmals 1998 von der Arbeitsgruppe um Kitada bei der Untersuchung von einigen japanischen Familien beschrieben (Kitada et al. 1998). Parkin ist als eine E3-Ligase Bestandteil des UPS und nimmt eine besondere Stellung unter den mit Parkinson-assoziierten Genen ein. Bis zu 50% der autosomal rezessiven (Lücking et al. 2000) und zusätzlich noch 15% aller sporadischen *Early-Onset*-Formen, d.h. mit einem Beginn der Erkrankung vor dem 40. Lebensjahr, können auf Mutationen im Parkin-Gen zurückgeführt werden (Periquet et al. 2003).

1.2.1 Klinische Erscheinung der Parkin-assoziierten Parkinson-Erkrankung

Klinisch zeigt der Parkin-assoziierte MP die typischen Symptome (Brady- oder Akinese, Rigor und Tremor). Besonders ist jedoch der frühe Erkrankungsbeginn, meist vor dem 40. Lebensjahr. Die Symptome sprechen gut auf eine L-Dopa-Therapie an. Als zusätzliche Symptome konnten eine Dystonie der Füße zu Beginn der Erkrankung, Hyperreflexie der unteren Extremität und eine langsame Progression bei Patienten beobachtet werden (Ishikawa und Tsuji 1996).

1.2.2 Zellbiologische und molekulare Charakteristika

Das Parkin-Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 6 (6q25.2-q27). Mit mehr als 1.5 Megabasen ist es eines der größten Gene des menschlichen Genoms. Seine 12 Exons kodieren für ein Protein mit 465 Aminosäuren (AS) und einem Molekulargewicht von 52 kDa. Parkin ist hoch konserviert und zeigt Orthologien in verschiedenen Spezies (Horowitz et al. 1999, Kitada et al. 2000). Das Protein wird neben dem Gehirn noch in zahlreichen Geweben exprimiert, unter anderem im Herz, Hoden und Skelettmuskel (Kitada et al. 1998). Im Gehirn wird Parkin ubiquitär in allen neuronalen Zelltypen exprimiert.

In der Zelle ist Parkin hauptsächlich im Zytoplasma lokalisiert (Shimura et al. 1999). Daneben zeigen Studien auch Assoziationen von Parkin mit dem Golgi-Apparat (Kubo et al. 2001, Shimura et al. 1999), synaptischen Vesikeln (Fallon et al. 2002, Kubo et al. 2001), der äußeren Membran von Mitochondrien (Lin TK et al. 2009) und Elementen des Zytoskeletts, wie Aktin (Huynh et al. 2000) und Tubulin (Ren et al. 2003). Parallel hierzu wurde eine Anreicherung im Nukleus beschrieben (Stichel et al. 2000).

In der Primärstruktur von Parkin lassen sich fünf funktionelle Domänen beschreiben (s. Abb. 1.1). Am N-Terminus von der AS 1-76 befindet sich eine *Ubiquitin-like*-Domäne (UBL), die

zahlreiche Homologien zu Ubiquitin aufweist. Darüber hinaus verfügt Parkin am C-Terminus über zwei sogenannte RING (*Really interesting new gene*)-Regionen, die durch eine IBR (*In-between RING*)-Domäne getrennt sind (von Coelln et al. 2004). Zwischen der UBL und dem ersten RING-Motiv befindet sich noch eine so genannte Linkerregion.

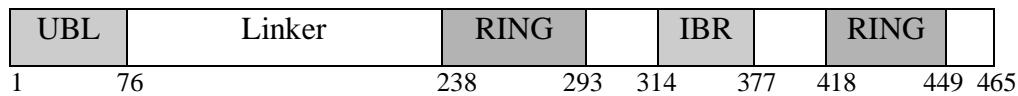


Abb. 1.1: Schematische Zeichnung der Primärstruktur von Parkin. Parkin besteht aus einer N-terminalen UBL-Domäne, einer zentralen Linkerregion und zwei C-terminalen RING-Domänen mit einer dazwischen liegenden IBR-Domäne (Modifiziert nach von Coelln et al. 2004, S. 176).

Seit der Entdeckung der ersten Deletionsmutation im Exon 5 (Kitada et al. 1998) konnten noch zahlreiche Mutationen im Parkin-Gen identifiziert werden: Deletionen in einzelnen oder mehreren Exons, Duplikationen oder Triplikationen von Exons, Frameshift- und Punktmutationen, die zum Austausch einer AS führen (Missense) oder den Einbau eines Stopcodons zur Folge haben (Nonsense) (Abbas et al. 1999, Lücking et al. 2000, West et al. 2002). Ein Großteil der Punktmutationen betrifft die sogenannte Ring-Box, d.h. RING-IBR-RING-Region am C-Terminus von Parkin und hier besonders die erste RING-Domäne (von Coelln et al. 2004) (s. Abb. 1.2). Die RING-Box ist wichtig für die Rekrutierung der E2-Ligasen und repräsentiert die katalytische Gruppe (Zhang et al. 2000). Es ist daher nicht verwunderlich, dass eine Vielzahl der familiären Punktmutation in dieser Region gefunden wurde (Lim et al. 2003, von Coelln et al. 2004). Einen eindeutigen Mutationshotspot gibt es jedoch nicht, da die Mutationen über das ganze Parkin-Gen verteilt sind.

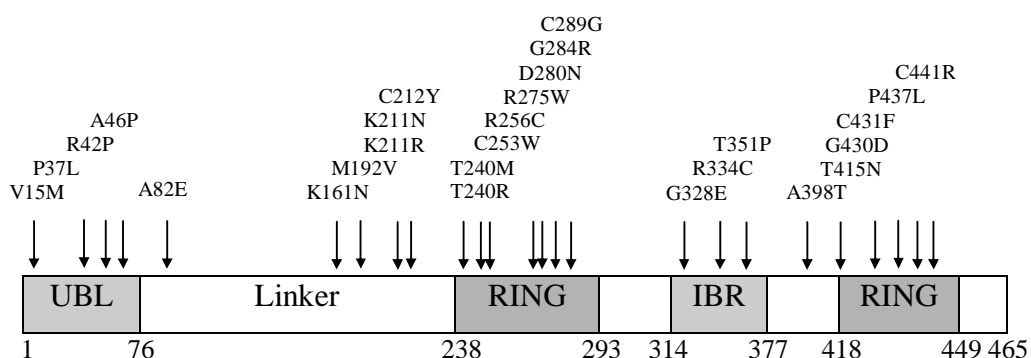


Abb. 1.2: Schematische Zeichnung von Parkin und mit Parkinson assoziierte Mutationen. Die Lokalisationen der Missense- oder Nonsense-Mutationen sind mit Pfeilen gekennzeichnet (Modifiziert nach von Coelln et al. 2004, S.176).

1.2.3 Physiologische Funktion

In den letzten Jahren wurden zahlreiche Proteine mit RING-Motiv, so auch Parkin als Ubiquitin-E3-Ligase identifiziert (Imai et al. 2000, Shimura et al. 2000, Zhang et al. 2000). E3-Ligasen sind Teil des UPS und markieren Proteine mit Ubiquitin, welches als Erkennungssequenz für die Degradation durch das Proteasom dient.

Aufgrund seiner Funktion im Ubiquitin-Proteasom-System wurde vermutet, dass die durch Funktionsverlust von Parkin angehäuften Substrate toxisch sind und so zum Untergang der Zelle führen (Kahle und Haass 2004).

Neben der gut beschriebenen Funktion als E3-Ligase gibt es einige Hinweise, dass Parkin neuroprotektiv wirkt. So gleicht Parkin den negativen Effekt von mutiertem α -Synuclein und proteasomalen Inhibitoren auf Be-M17-Zellen aus (Petrucelli et al. 2002). In vivo schützt Parkin vor einer durch Überexpression von Pael-R oder α -Synuclein bedingten Toxizität (Yang Y et al. 2003). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Parkin unter physiologischen Bedingungen in die mitochondriale Homöostase involviert ist. Zudem scheint Parkin die Autophagie bei mitochondrialer Dysfunktion zu induzieren (Nuytemans et al. 2010).

Des Weiteren scheint Parkin auch als Tumorsuppressorgen in der Karzinogenese von zahlreichen soliden Tumoren wie etwa den Ovarial- oder Mamma-Karzinomen, aber auch bei verschiedenen hämatologischen Tumoren eine Rolle zu spielen (Cesari et al. 2003).

1.2.3.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Das UPS stellt den wichtigsten selektiven Mechanismus für eukaryotische Zellen dar, um mutierte, fehlgefaltete und beschädigte Proteine abzubauen (Lim und Tan 2007).

Daneben hat dieses System über den Abbau von verschiedenen kurz- und langlebigen Proteinen modulierenden Einfluss auf zahlreiche zelluläre Prozesse.

Für die Degradation erfolgt zunächst eine Markierung der Proteine durch reversible kovalente Bindung kleiner spezifischer Proteine. Am bekanntesten ist die Verknüpfung mit Ubiquitin, einem 8 kDa großen Protein. Der Übertragungsprozess von Ubiquitin an die Substratproteine findet mit Hilfe von 3 Enzymklassen statt (Ciechanover und Brundin 2003). Durch ein sogenanntes E1-Enzym wird Ubiquitin unter Verbrauch von ATP aktiviert. In einem zweiten Schritt erfolgt die Übertragung des aktivierten Ubiquitins auf ein Cystein im aktiven Zentrum eines E2-Enzyms. Für die spezifische Ubiquitinylierung wird zuletzt eine E3-Ligase benötigt. Dieses Enzym erkennt das Substratprotein und katalysiert die kovalente Bindung des Ubiquitins an Lysin-Reste des Substrats (s. Abb. 1.3). Da Ubiquitin selbst über Lysin-Reste

verfügt, entsteht durch mehrfache Wiederholung dieses Vorganges eine Polyubiquitinkette, die dem Proteasom als Erkennungssequenz dient (Hochstrasser 1996).

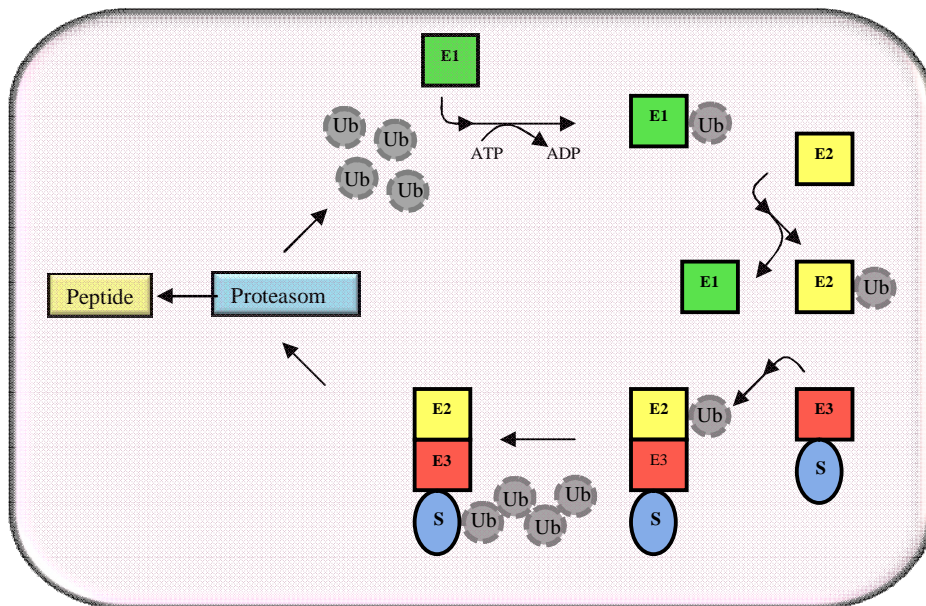


Abb. 1.3: Das Ubiquitin-Proteasom-System. Das E1-Enzym aktiviert Ubiquitin unter Verbrauch von ATP. Darauf erfolgt die Übertragung des Ubiquitins auf ein E2-Enzym. Die E3-Ubiquitin-Ligase katalysiert die Bindung von Ubiquitin an das gebundene Substrat. S: Substrat; Ub: Ubiquitin (modifiziert nach Betarbet et al. 2005, S. 19).

Das Proteasom ist ein großer Protease-Komplex, der nach seinem Sedimentationskoeffizient auch 26S-Proteasom genannt wird und aus zwei Teilkomplexen besteht (s. Abb. 1.4). Das zentrale fassähnliche 20S-Proteasom ist aus α - und β -Untereinheiten aufgebaut, die in Form eines hohlen Zylinders angeordnet sind. Die Innenseite der β -Untereinheiten besitzt die proteolytische Aktivität (Baumeister et al. 1998).

Die zweite Untereinheit ist die 19S-Kappe und befindet sich jeweils an den beiden äußeren Anteilen des 20S-Komplexes (Baumeister et al. 1998). Dieser vermittelt die Erkennung und Entfaltung der ubiquitinylierten Substrate, ihre Deubiquitinylierung, sowie die Translokation ins Lumen des 20S-Proteasoms (Glickman et al. 1998).

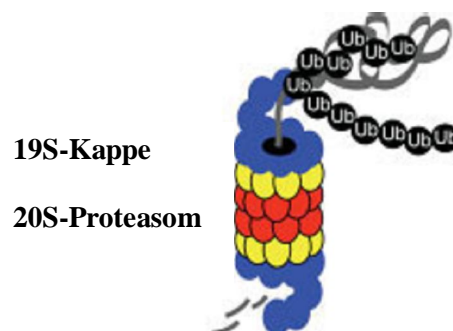


Abb. 1.4: Das 26S-Proteasom. Das 26S-Proteasom besteht aus zwei Teilkomplexen. Dargestellt ist das 20S-Proteasom mit den ringförmig angeordneten proteolytischen α - und β -Untereinheiten und die ober- und unterhalb der 20S-Untereinheit befindlichen 19S-Kappen (modifiziert nach Olanow und McNaught 2006 S. 1810).

1.2.3.2 Unterschiedliche Arten der Ubiquitinylierung

Ubiquitinylierung spielt nicht nur bei der proteasomalen Degradation, sondern auch in der post-translationalen Modifikation von Proteinen eine Rolle.

Für die Bedeutung der Ubiquitinylierung sind die Verknüpfung der Ubiquitin-Moleküle untereinander und die Länge der Ubiquitinkette entscheidend (Hicke 2001) (s. Abb. 1.5). Da Ubiquitin über mehrere Lysinreste verfügt, können die Moleküle unterschiedlich verbunden werden.

Eine Polyubiquitinylierung über Lysin-48 markiert Proteine für den proteasomalen Abbau (Hochstrasser 1996). Parkin besitzt ein Lysin-48 in der UBL-Region. So ist es nicht verwunderlich, dass Parkin durch Selbstubiquitinylierung auch seinen eigenen Abbau fördert (Zhang et al. 2000).

Hingegen spielt eine Verknüpfung der Ubiquitinmoleküle über Lysin-63 bei der posttranslationalen Modifikation eine Rolle. Endozytose, DNA-Reparatur und Aktivierung von Proteinkinasen können so veranlasst werden. Monoubiquitinylierung konnte unter anderem bei der Regulation von Histonen (Robzyk et al. 2000) und der Endozytose von Plasmamembran-Proteinen (Hicke 1999) beobachtet werden. Anders als bei der Polyubiquitinylierung über Lysin-48 sind monoubiquitinylierte Proteine stabil oder werden nach der Endozytose von Lysosom abgebaut (Hicke 2001).

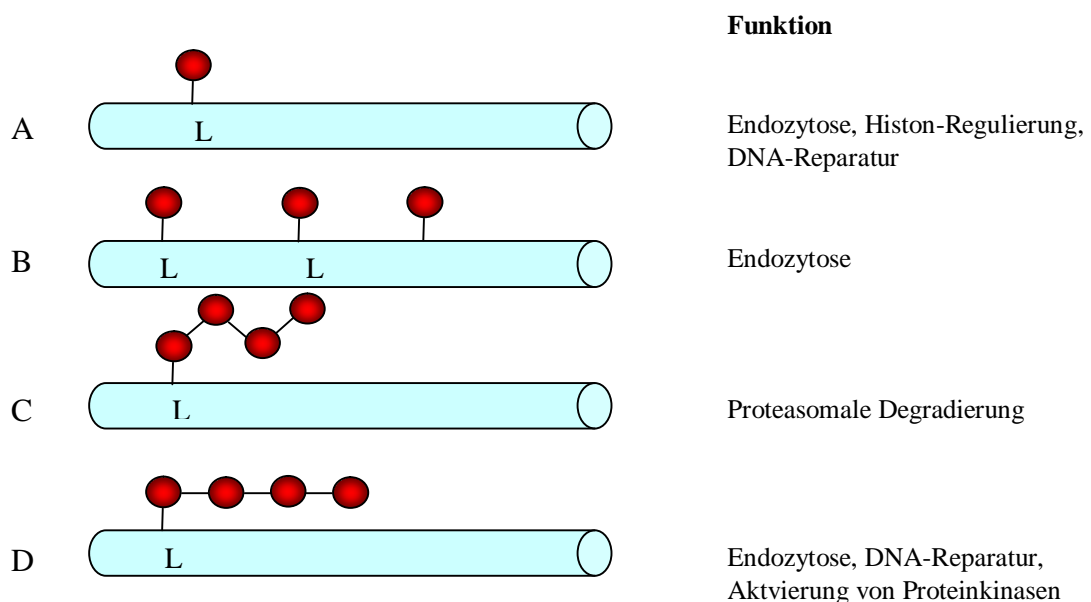


Abb. 1.5: Unterschiedliche Arten der Ubiquitin-Verknüpfung. Proteine können an einem (Monoubiquitinylierung) oder an mehreren (Multimonoubiquitinylierung) Lysin-Resten mit einem Ubiquitin-Rest verknüpft werden (A, B). Bei Polyubiquitinylierung über Lysin-48 erfolgt eine proteasomale Degradierung des markierten Proteins (C). Konjugation einer Polyubiquitinkette über Lysin-63 hat dagegen eine regulatorische Funktion (D). L= Lysinrest (modifiziert nach Hicke 2001, S. 195).

1.2.4 Interagierende Proteine und Substrate

Entsprechend der Funktion als E3-Ligase bindet Parkin an zahlreiche E2-Enzyme (s. Tab. 1.2). Sowohl die Arbeitsgruppe um Shimura als auch um Imai haben die zytoplasmatisch lokalisierten UbcH7 (*Ubiquitin-conjugating human enzyme*) und UbcH8 als Interaktoren für Parkin beschrieben (Shimura et al. 2000, Imai et al. 2000). Zusätzlich interagieren noch die mit dem Endoplasmatischen Retikulum assoziierten E2-Ligasen Ubc6 und 7 (*Ubiquitin-conjugating enzym*) mit Parkin (Imai et al. 2001).

E2-Ligase	Lokalisation	Referenz
UbcH7	Zytoplasmatisch	Shimura et al. 2000 Imai et al. 2000
UbcH8	Zytoplasmatisch	Zhang et al. 2000 Imai et al. 2000
Ubc6	Endoplasmatisches Retikulum	Imai et al. 2001
Ubc7	Endoplasmatisches Retikulum	Imai et al. 2001

Tab. 1.2: Beschriebene Parkin interagierende E2-Enzyme und deren intrazelluläre Lokalisation. Ubc: *Ubiquitin-conjugating enzyme*, UbcH: *Ubiquitin-conjugating human enzyme*

Neben den E2-Ligasen wurden zahlreiche andere Bindungspartner für Parkin beschrieben (s. Tab. 1.3). So hat Parkin zusätzlich zu der Bindung an das Proteasom Einfluss auf zelluläre Proteinfaltungshelfer (Chaperone) wie etwa CHIP (*Carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein*), Hsp70 (Hitzeschockprotein) und das Cochaperon BAG5 (*Bcl-2-associated athanogene 5*). Des Weiteren scheint Parkin mit anderen Parkinson-assoziierten Genen zu interagieren. So bindet Parkin etwa an PINK1 (Um et al. 2009) und kann die durch Parkinson-typische Mutationen im PINK1-Gen verursachten morphologischen Veränderungen von Mitochondrien wiederherstellen (Exner et al. 2007). Auch eine Interaktion mit DJ-1-Mutanten (Moore et al. 2005) und sogar eine Komplexbildung aus den drei Proteinen wurde beschrieben (Xiong et al. 2009).

Parkin-interagierende Proteine	Mögliche Funktion	Referenz
BAG5	Cochaperon	Kalia SK et al. 2004
Rpn-10 α 4 S5a	Proteasomale Untereinheit	Sakata et al. 2003 Dächsel et al. 2005 Safadi und Shaw 2010
PINK1	Mitochondriale Kinase	Exner et al. 2007 Um et al. 2009
Hsp70	Chaperon	Imai et al. 2002
CHIP	Chaperon, E3-Ligase	Imai et al. 2002
DJ-1-Mutanten	Redox-Proteine ?	Moore et al. 2005
p32	Mitochondriales Protein	Li et al. 2011
Ambra1	Reguliert Autophagie	Van Humbeeck et al. 2011
Aktin-Filamente	Zytoskelett	Huynh et al. 2000
CASK/Lin2	Plasmamembran-Protein	Fallon et al. 2002
Cullin-1	Multiprotein-Ligase	Staropoli et al. 2003
LRRK2	Kinase	Smith et al. 2005

Tab. 1.3: Potentiell Parkin-interagierende Proteine und deren Funktion. CASK: Ca^{2+} -calmodulin-dependent serine protein kinase, Ambra: activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy

Abbildung 1.6 zeigt schematisch die Bindungsstellen einiger Cofaktoren an die Primärstruktur von Parkin. Teile des 19S-Proteasoms binden an die UBL-Domäne. E2-Ligasen, Hsp70 und das Cochaperon CHIP binden an die RING-Box am C-Terminus (Kahle und Haass 2004). Für BAG5 wurde die Linker-Region als Bindungsstelle beschrieben (Kalia SK et al. 2004).

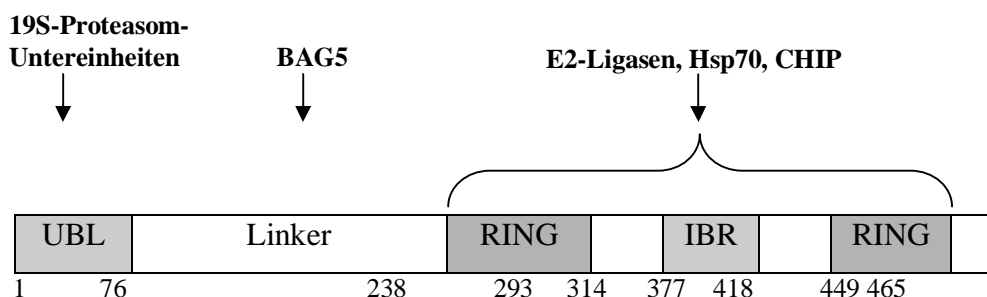


Abb. 1.6: Schematische Zeichnung von Parkin und den Bindestellen einiger Interaktoren. An die UBL-Region binden vor allem Teile des 19S-Proteasoms. Verschiedene Coenzyme wie beispielsweise E2-Ligasen, Hsp70 oder CHIP binden vor allem an den C-Terminus. Für BAG5 wurde die Linker-Region als Bindungsstelle beschrieben (Abbildung modifiziert nach Kahle und Haass 2004, S. 682).

Bis heute wurden zahlreiche Substrate der E3-Ligase Parkin mit verschiedenster zellulärer Lokalisation und Funktion durch Yeast-two-hybrid- oder Co-Immunoprecipitationsversuche entdeckt (s. Tab. 1.4): Proteine, die einen Einfluss auf die Freisetzung von synaptischen Vesikeln haben, wie etwa das CDCrel-1 (*Cell division control related protein*) (Zhang et al. 2000), Kontrollproteine des Zellzyklus wie Cyclin E (Staropoli et al. 2003), Teile des Proteinsynthese-Apparates (Corti et al. 2003, Ko et al. 2006), Proteine von Signaltransduktionskaskaden wie etwa der Pael-Rezeptor (*Parkin-associated endothelin-like receptor*) (Dusonchet et al. 2009, Imai et al. 2001), Teile des Zytoskeletts (Huynh et al. 2007, Ren et al. 2003) oder Kerntransportproteine (Um et al. 2006). Hierdurch zeigt sich die vielfältige Bedeutung des Parkin-Proteins, vor allem für das Nervensystem.

Substrat	Mögliche Bedeutung
CDCrel-1 CDCrel-2a αSp22 Synphilin-1 Synaptotagmin XI DAT	<i>Vesikel und Synapse</i> Zhang et al. 2000 Choi et al. 2003 Shimura et al. 2001 Chung et al. 2001 Huynh et al. 2003 Jiang H et al. 2004
Cyclin E	<i>Zellzyklus</i> Staropoli et al. 2003
p38 FBP1	<i>Proteinbiosynthese</i> Corti et al. 2003 Ko et al. 2006
Pael-R	<i>Zell. Transduktion/Signalkaskaden</i> Imai et al. 2001, Dusonchet et al. 2009
α/βTubulin Ataxin-2	<i>Zytoskelett</i> Ren et al. 2003 Huynh et al. 2007
RanBP2	<i>Kerntransport</i> Um et al. 2006

Tab. 1.4: Mögliche Parkin-Substrate und deren Bedeutung. αSp22: O-glykosyliertes α-Synuclein, DAT: Dopamin-Transporter, FBP1: *Far upstream sequence element-binding protein-1*, Pael-R: *Parkin-associated endothelin-like receptor*, RanBP2: *Ran-binding protein 2*.

1.3 BAG1

BAG1 wurde ursprünglich als Bindungspartner für das anti-apoptotische Protein Bcl-2 beschrieben (Takayama et al. 1995).

Neben BAG1 zählen noch 5 weitere Proteine zur BAG-Familie (BAG2-6) (Takayama et al. 1999). Gemeinsam haben diese Proteine eine evolutionär konservierte BAG-Domäne an ihrem Carboxy-Terminus (Takayama et al. 1999), die zwischen 110 und 124 AS lang ist. Auch in anderen Spezies wie beispielsweise der Maus oder Drosophila kann diese BAG-Domäne nachgewiesen werden (Doong et al. 2002). Von BAG1 wurden 4 Isoformen beschrieben (BAG1, BAG1-L, -M und -S), die sich lediglich in ihre Größe unterscheiden und durch alternatives Splicing entstehen (Takayama et al. 1998, Yang X et al. 1998).

1.3.1 Physiologische Funktion von BAG1 und seine Interaktionspartner

BAG1 hat durch seine zahlreichen Interaktionspartner Einfluss auf viele zelluläre Prozesse, wie Zellproliferation, Proteindegradierung, Transkription und Apoptose (s. Tab. 1.5).

Die anti-apoptotische Wirkung von Bcl-2 wird durch BAG1 verstärkt (Takayama et al. 1995). Zusätzlich fungiert es als Cochaperon und nukleärer Austauschfaktor für das Chaperon Hsp70 (Alberti et al. 2003). BAG1 vermag die Aktivität von Hsp70 und die anschließende Substratfreigabe zu stimulieren (Gassler et al. 2001, Liman et al. 2005, Takayama et al. 1997). Einige Studien zeigen jedoch auch einen inhibierenden Einfluss von BAG1 auf die Aktivität von Hsp70 (Bimston et al. 1998, Nollen et al. 2001, Novoselov et al. 2005). Diese Diskrepanz verdeutlicht die Komplexität der zellulären Faltungsmaschinerie und deren Abhängigkeit von Cofaktoren.

Vor allem im Nervensystem spielt BAG1 eine wichtige Rolle. Es stimuliert die neuronale Differenzierung (Kermer et al. 2002), schützt vor einem ischämischen Schaden und zahlreichen anderen apoptotischen Stimuli, wie etwa dem Glutamat-induzierten Zelltod (Kermer et al. 2003). Des Weiteren hat BAG1 über die Stimulation von Raf-1 (*Rapidly growing fibrosarcoma or rat fibrosarcoma-1*), einer Serin/Threonin-Kinase, die den MAP-Kinase Weg aktiviert, Einfluss auf Zellwachstum und Differenzierung (Song et al. 2001).

Sowohl Hsp70 als auch Raf-1 binden an die BAG-Domäne (s. Abb. 1.9). Diese besteht aus drei anti-parallelen α -Helices, wobei die zweite und dritte Helix mit der ATPase Domäne von Hsp70 interagiert und die ersten Beiden mit Raf-1 (Song et al. 2001). Die gleichzeitige Bindung der beiden Proteine schließt sich damit aus, sodass vermutet wird, dass Hsp70 und Raf-1 um die Bindung an BAG1 konkurrieren. In Abhängigkeit von der zellulären Situation

kann BAG1 so entweder das Zellwachstum stimulieren oder auf zellulären Stress reagieren (Song et al. 2001).

Die enorme Bedeutung der BAG-Domäne für die neuroprotektive Wirkung von BAG1 verdeutlichte eine Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass BAG Δ C, eine Deletionsmutante des BAG1, die durch den Verlust von 29 AS am C-Terminus einen Teil der BAG-Domäne einbüßt, seine Fähigkeit, mit Hsp70 zu interagieren, und damit seine neuroprotektive Wirkung verliert. Des Weiteren zeigte sich, dass die BAG-Domäne für die zelluläre Lokalisation des Proteins entscheidend ist. BAG Δ C ist, anders als BAG1, nur zytoplasmatisch lokalisiert (Liman et al. 2005).

Neben der BAG-Domäne ist die N-terminale UBL-Domäne eine Region, die sich in allen BAG1-Proteinen finden lässt (Doong et al. 2002) (s. Abb. 1.7). Hier binden Teile des UPS, wie das 26S-Proteasom und die E3-Ligase CHIP. BAG1 scheint ein Substrat von CHIP zu sein (Alberti et al. 2002). Durch die Bildung eines ternären Komplexes aus BAG1, CHIP und Hsp70 erfolgt eine verstärkte Ubiquitinylierung von BAG1. Diese scheint jedoch nicht den Abbau von BAG1 zu induzieren, sondern die Assoziation von BAG1 an das Proteasom zu fördern, wo BAG1 regulatorisch tätig ist (Alberti et al. 2002). Durch die Bindung an CHIP wird etwa der Abbau des Glukokortikoid-Rezeptors verstärkt (Demand et al. 2001).

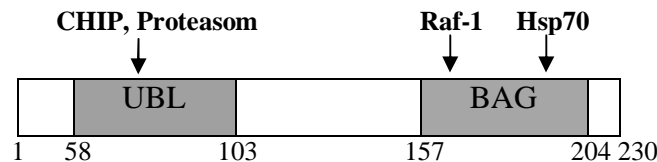


Abb. 1.7: Schematische Zeichnung von BAG1 und Bindestellen einiger Interaktoren. Die Primärstruktur von BAG1 besteht aus einer N-terminalen UBL-Domäne, an die das Proteasom und die E3-Ligase CHIP binden, und aus einer C-terminalen BAG-Domäne, die Bindungsstellen für Raf-1 und Hsp70 aufweist (modifiziert nach Takayama et al. 1999, S. 782).

Auch bei anderen Mitgliedern der BAG-Familie konnte eine Verbindung zwischen den Chaperonen und dem UPS dokumentiert werden. BAG5 interagiert sowohl mit Parkin als auch mit Hsp70 und führt über die Inhibition der beiden zur Aggregation von Parkin, seinen Substraten und zu einem vermehrten Zelluntergang (Kalia SK et al. 2004). BAG2 konnte als ein spezifischer Inhibitor der E3-Ligase CHIP identifiziert werden (Arndt et al. 2005) und BAG3 soll die proteasomale Degradation von Hsp70 abhängigen Proteinen hemmen (Doong et al. 2003). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass BAG-Proteine eine wichtige Verbindung zwischen den Chaperonen und dem UPS darstellen.

Bei einigen Erkrankungen spielt BAG1 eine Rolle in der Pathogenese. Durch die Interaktion zu DJ-1 konnte bereits eine Verbindung zum erblichen MP gezogen werden (Deeg et al. 2010). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass BAG1 Tau-Proteine stabilisiert

(Elliott et al. 2007). Bei Patienten mit Morbus Alzheimer zeigte sich zudem eine erhöhte Expression von BAG1-M im Hippocampus und somit ein verminderter Abbau von Tau-Proteinen (Elliott et al. 2009). Auch bei der Entstehung von Tumoren spielt BAG1 als Protoonkogen eine Rolle und konnte in einigen Tumoren, wie etwa Mamma-, Prostata oder auch Kolon-Karzinomen, überexprimiert nachgewiesen werden (Doong et al. 2002).

Tabelle 1.5 zeigt weitere Bindungspartner, den Effekt von BAG1 auf ihre Funktionalität und die jeweiligen interagierende Isoform von BAG1.

BAG1 interagierende Proteine	Effekt	BAG1-Isoform	Referenz
Bcl-2	+	BAG1	Takayama et al. 1995
Hsp70	+/-	Alle	Takayama et al. 1997 Nollen et al. 2001 Liman et al. 2005
Raf-1	+	BAG1	Song et al. 2001
CHIP	+	BAG1	Demand et al. 2001
Proteasom		BAG1	Demand et al. 2001 Alberti et al. 2002
Vitamin-D-Rezeptor	-	BAG1	Liu et al. 1998
Glukokortikoid-Rezeptor	-	BAG1-L BAG1-M	Kullmann et al. 1998
Androgen-Rezeptor	+	BAG1-L	Froesch et al. 1998
Siah 1	-	BAG1	Matsuzawa et al. 1998
DNA (Stimulation der Transkription)	+	BAG1-L BAG1-M	Zeiner et al. 1999
<i>Hepatocyte growth factor; Platelet-derived growth factor</i>	+	BAG1	Bardelli et al. 1996
<i>Heparin-binding EGF-like growth factor</i>	+	BAG1	Lin J et al. 2001
Tau	+	BAG1	Elliott et al. 2007
DJ-1	+	BAG1	Deeg et al. 2010

Tab. 1.5: Mögliche Interaktionspartner von BAG1. Ein Plus-Symbol bedeutet einen stimulatorischen Effekt auf den Bindungspartner, ein Minus-Symbol indiziert einen inhibitorischen Effekt (modifiziert nach Sroka 2008, S.28). Siah 1: *seven in absentia homolog 1*

1.4 Fragestellung der Arbeit

Parkin spielt als Teil des UPS eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des autosomal rezessiv vererbten MP (Lücking et al. 2000). Eine Verminderung der Parkin-Aktivität, beispielsweise durch S-Nitrosylation, kann zudem den Zelluntergang der dopaminergen Neurone beim sporadischen MP verstärken (Chung et al. 2004). Untersuchungen von Parkin bieten daher auch eine Möglichkeit, die Pathogenese des sporadischen MP besser zu verstehen. BAG1 wirkt als Cochaperon des Hsp70 neuroprotektiv und zahlreiche Studien konnten beweisen, dass es ein wichtiges Bindeglied zwischen den Chaperonen und dem UPS darstellt (Alberti et al. 2002, Demand et al. 2001, Matsuzawa et al. 1998). BAG5, ein weiteres Mitglied der BAG-Familie, konnte bereits als inhibierender Interaktionspartner von Parkin identifiziert werden (Kalia SK et al. 2004).

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit ist, eine Interaktion zwischen BAG1 und Parkin darzustellen, die interagierende Parkin-Domäne näher zu beschreiben, Auswirkungen von BAG1 auf die E3-Ligase-Funktion von Parkin sowie eine mögliche Veränderung in der Ubiquitinylierung und Löslichkeit von Parkin zu untersuchen.

Die Fragestellung der vorliegenden Dissertation wurde mit folgenden Arbeitshypothesen konkretisiert:

1. In Co-Immunoprecipitations-Versuchen sollte eine Proteinbindung zwischen Parkin und BAG1 dargestellt werden.
2. Durch Klonierung von Parkin-Deletionsmutanten und Co-Immunoprecipitations-Versuchen mit diesen und BAG1 sollte die Interaktionsstelle an Parkin identifiziert werden.
3. Für die funktionelle Analyse der Proteinbindung sollte der Einfluss von BAG1 auf die E3-Ligasefunktion von Parkin durch Untersuchung der Ubiquitinylierung und Halbwertszeit des Parkin-Substrates CDCrel-1 bestimmt werden.
4. Die Beeinflussung von BAG1 auf die zelluläre Lokalisation und die Löslichkeit von Parkin sollten durch spezielle Zellyseverfahren (subzelluläre Lysierung, Harnstofflyse), Dot-Blot-Analysen und Immunozytochemie-Versuche untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Klonierung

Klonierung beschreibt die Einführung eines DNA-Fragments (Insert) in einen Plasmid-Ring (zirkuläre doppelsträngige DNA). Durch den Verdau mit Restriktionsendonukleasen wird das Insert und der Plasmidring an spezifischen Punkten geschnitten (Restriktionsschnittstellen), um im Anschluss durch das Enzym T4-DNA-Ligase miteinander verknüpft zu werden (Ligation). Bei einer Klonierung können bestimmte Signalpeptide, sogenannte *tags*, an das DNA-Fragment angehängt werden (z. B. HA-, FLAG- oder GFP-tag). Kompetente E.coli Bakterien werden mit dem fertigen Plasmidring transformiert und vervielfältigen die DNA. Die selektive Vermehrung wird durch Antibiotikaresistenzen im Plasmidring gewährleistet. Anschließend kann die vervielfältigte DNA durch Expression in verschiedenen Zellreihen untersucht werden.

Zur Untersuchung der genauen Interaktionsstelle zwischen Parkin und BAG1 wurden verschiedene Parkin-Deletionsmutanten kloniert.

2.1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient zur selektiven Amplifizierung von DNA-Fragmenten mittels thermostabiler DNA-Polymerase und spezifischer Oligonukleotide (Primer). Zur Herstellung der Parkin-Deletionsmutanten wurde folgender PCR-Ansatz verwendet:

50 ng Template DNA

5 µl 10x PFU Puffer (Stratagene, La Jolla, USA)

2 µl 10 mM dNTP (Amersham Biosciences, Freiburg)

1 µl 10µM Primer 1 (Sigma Aldrich, Steinheim)

1 µl 10µM Primer 2 (Sigma Aldrich, Steinheim)

2,5 U PFU-Polymerase (Stratagene, La Jolla, USA)

Mit H₂O auf 50 µl auffüllen.

Die PCR-Reaktion wurde im Mastercycler Gradient der Firma Eppendorf (Hamburg) nach folgendem Schema durchgeführt:

Phase	Zeitdauer	Temperatur	Zyklen
Denaturierung	5 min	95°C	1
Denaturierung	20 sec	95°C	35
Primeranlagerung	20 sec	50-60°C	
Polymerisation	90 sec	72°C	
Polymerisation	5 min	72°C	1

Bis zur weiteren Verarbeitung wurde das PCR-Produkt bei 4°C gelagert. Zur Erfolgskontrolle erfolgte eine Agarosegel-Elektrophorese mit 5 µl des PCR-Ansatzes (s. 2.1.5).

2.1.2 Verwendete Primer

Parkin FW ΔUBL: EcoRI

5`AATAGAATTCATGGAAAAGTCAAGAAA 3`

Parkin FW ΔLINKER: EcoRI

5`AATAGAATTCATGCACCCACCTCTGAC 3`

Parkin FW ΔRING1: EcoRI

5`AATAGAATTCATGCCATCACTTCAGGAT 3`

Parkin FW ΔIBR: EcoRI

5`AATAGAATTCATGAGGCCTACAGAGTCG 3`

Für die vier oben genannten Forward-Primer wurde einheitlich folgender Backward-Primer verwendet:

Parkin BW: NotI

5`AATAGCGGCCGCTTACTACACGTCGAA 3`

Vektor: FLAGpcDNA3.1

Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen:

A/GAATTC	<i>EcoRI</i>
GC/GGCCGC	<i>NotI</i>

Alle verwendeten Primer wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) hergestellt.

2.1.3 Aufreinigung des PCR-Produktes

Die Aufreinigung des PCR-Produktes erfolgte mit dem Pure Link™ PCR Purifikation Kit der Firma Invitrogen (Darmstadt) nach Protokoll mit den beigefügten Puffersystemen.

Zunächst wurden 200 µl des mit Isopropanol versetzten Bindungspuffers oder Bindungspuffers HC zu den 50 µl PCR-Volumen gegeben und vermischt. Das Puffer-Proben-Gemisch wurde auf eine mitgelieferte Säule geladen. Darauf erfolgte eine 1-minütige Zentrifugation in der Biofuge fresco der Firma Heraeus (Hanau) bei Raumtemperatur (RT) und 10000 rpm. Die im Sammel tube aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen und zur Säule 650 µl ethanolhaltiger Waschpuffer hinzugefügt. Es folgte eine weitere Zentrifugation mit den oben genannten Bedingungen. Die Flüssigkeit wurde erneut verworfen und die Säule für weitere 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen. Nach der Überführung der Säule in ein neues Eppendorf-Tube wurde diese mit 50 µl Elutionspuffer beladen und für 1 Minute (min) bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation für 2 min bei 13000 rpm wurde die DNA in ein Eppendorf-Tube eluiert und bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

2.1.4 Restriktionsenzymverdau

Zur Vorbereitung des gereinigten PCR-Produktes auf die Ligation wurde ein Verdau mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Hierfür wurde sowohl das Insert als auch der Vektor mit den gleichen Enzymen verdaut.

Für den Restriktionsverdau wurde folgender Ansatz verwendet:

- 1 µl DNA
- 1 µl 10x Enzym-Puffer
- ggf. 1 µl 10x BSA (1 mg/ml)
- 0,5 µl Restriktionsenzym 1 (EcoRI 20000U/ml)
- 0,5 µl Restriktionsenzym 2 (NotI 10000 U/ml).

Der Ansatz wurde mit H₂O auf 10 µl eingestellt.

Der Restriktionsverdau-Ansatz wurde für 16 Stunden (Std) bei 37°C inkubiert und nach der Inaktivierung der Enzyme bis zur Agarosegel-Elektrophorese bei 4°C gelagert.

Alle Enzyme und Puffer wurden unter den vom Hersteller NEB (Frankfurt a. M) empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen verwendet.

2.1.5 Agarosegel-Elektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese können DNA-Fragmente ihrer Größe nach in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden.

Es wurde ein 1%iges Agarosegel (50 ml) in TBE-Puffer im Mini-Sub[®] Cell GT-Systems der Firma Bio-Rad (Hercules, USA) verwendet. Die Proben wurden mit 6x DNA-Puffer versetzt und in die Taschen des Agarosegels geladen. Als DNA-Marker wurde der 1 kb DNA Ladder Gen ruler der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 Volt (V) für ca. 1 Std bei RT.

Im Anschluss wurde die DNA durch Anregung der interkalierenden Substanz Ethidiumbromid mit UV-Licht, unter Verwendung des Fluor-STM-MultiImagers (Bio-Rad, Hercules, USA) und des Computerprogrammes Quantity One 4.2.2 der Firma Bio-Rad (Hercules, USA), detektiert.

Agarosegel	0,5 g Agarose 5 µl Ethidiumbromid (10mg/ml) in 1x TBE Puffer	Serva Elektrophoresis GmbH (Heidelberg) Sigma Aldrich (Steinheim)
10x TBE	37,2 g EDTA 540 g Tris 275 g Borsäure 5 l purifiziertes H ₂ O	Carl Roth GmbH (Karlsruhe) AppliChem GmbH (Darmstadt) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
6x DNA-Puffer	0,15 % Bromphenolblau 0,15 % Xylene cyanol FF 40 % Saccharose in H ₂ O	Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Amersham Biosciences (Freiburg) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

2.1.6 DNA-Aufreinigung aus Agarosegelen

Für die Weiterverarbeitung der aufgetrennten DNA-Fragmente wurden diese unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel getrennt. Im Anschluss erfolgte mit Hilfe des Pure Link™ Quick Gel Extraktion Kits der Firma Invitrogen (Darmstadt) die Aufreinigung der DNA. Diese wurde mit den beigegeführten Puffern nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Zunächst wurde das Gel gewogen und L3-Puffer in der dreifachen Menge des Gels in µl hinzugefügt. Unter Erwärmung auf 50°C für 10 min wurde das Gel aufgelöst. Zu der Lösung wurde die einfache Gelmenge Isopropanol hinzugefügt, vermischt und anschließend auf eine mitgelieferte Säule geladen. Die Säule wurde für 1 min bei 13000 rpm und RT zentrifugiert. Die im Waschtube aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen. Nach Applikation von 500 µl Waschpuffer auf die Säule erfolgte eine weitere Zentrifugation unter den oben genannten Bedingungen. Zur vollständigen Entfernung des Waschpuffers wurde erneut für 2 min zentrifugiert. Die DNA wurde durch Zugabe von 50 µl Elutionspuffer, 1-minütiger Inkubation bei RT und anschließender Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm eluiert.

Isopropanol	AppliChem GmbH (Darmstadt)
--------------------	----------------------------

2.1.7 Ligation

Bei einer Ligation wird ein DNA-Fragment (Insert) in einen Vektor mit Hilfe einer T4-DNA-Ligase eingefügt, sodass ein fertiger Plasmidring entsteht.

Hierfür wurde ein Ansatz aus 1 µl T4-DNA-Ligase, 2 µl 10x T4-Puffer, Vektor und Insert mit H₂O auf 17 µl aufgefüllt. Insgesamt betrug die DNA-Konzentration 100 ng. Die Berechnung der Gesamtmenge des Vektors und des Inserts wurden mit dem PC-Programm GENTle 1.9.4 unter zu Hilfenahme der jeweiligen DNA-Konzentration und der Anzahl der Basenpaare durchgeführt.

Der Ansatz wurde für 1 Std bei RT inkubiert und anschließend erfolgte die Inaktivierung der Ligase durch eine Erhitzung auf 65°C für 10 min.

T4-DNA-Ligase	400000 U/ml	NEB (Frankfurt am Main)
T4-DNA-Ligase-Puffer		NEB (Frankfurt am Main)

2.1.8 Plasmide

Konstrukt	Vektor	Restriktionsenzyme	Resistenz	Herkunft
Parkin	pcDNA3	HindIII, XbaI	Ampicillin	C. Lücking, Paris
GFP-Parkin	peGFP-N1	Xho, KpnI	Kanamycin	W. Gu, Paris
BAG1	pcDNA3	EcoRI, NotI	Ampicillin	P. Kermer, Göttingen
FLAG-BAG1	pcDNA3	EcoRI, NotI	Ampicillin	P. Kermer, Göttingen
BAGΔC	pcDNA3	EcoRI, NotI	Ampicillin	P. Kermer, Göttingen
GFP-BAG1	peGFP	Xho, KpnI	Kanamycin	P. Kermer, Göttingen
GFP-BAGΔC	peGFP	Xho, KpnI	Kanamycin	P. Kermer, Göttingen
GFP-LV	peGFP	MCS	Kanamycin	P. Kermer, Göttingen
LV	pcDNA	MCS	Ampicillin	P. Kermer, Göttingen
HA-CDCrel	pRK5-HA	SalI, Not I	Ampicillin	T. Dawson, Baltimore, USA
FLAG-Parkin _{ΔUBL}	pcDNA3.1	EcoRI, NotI	Ampicillin	J. Schünemann, Göttingen
FLAG-Parkin _{ΔLinker}	pcDNA3.1	EcoRI, NotI	Ampicillin	J. Schünemann, Göttingen
FLAG-Parkin _{ΔRing1}	pcDNA3.1	EcoRI, NotI	Ampicillin	J. Schünemann, Göttingen
FLAG-Parkin _{ΔIBR}	pcDNA3.1	EcoRI, NotI	Ampicillin	J. Schünemann, Göttingen

Tabelle 2.1. Verwendete Plasmide.

Sequenz der Signalpeptide (Tags)

FLAG DYKDDDDK
MYC EQKLISEEDL
HA YPYDVPDYA

2.1.9 Sequenzierung

Über den Verdau mit Restriktionsendonukleasen kann nur die Anwesenheit und Lage eines Inserts im Plasmid überprüft werden, jedoch nicht die korrekte Basenfolge. Daher wurde zum Ausschluss von ungewollten Punktmutationen eine zusätzliche Sequenzierung durchgeführt. Die Basenfolge konnte dann manuell mit der bekannten Basensequenz verglichen werden. Die Sequenzierung erfolgte durch das Sequenzierungslabor „Seqlab“ in Göttingen. Für die Sequenzierung wurde folgender Ansatz verwendet:

700 ng DNA, 1 μl T7-Primer, 1 μl SB6-Primer, mit H₂O auf 7 μl auffüllen.

2.1.10 Messung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde 2 µl der Plasmid-DNA in 60 µl H₂O gelöst. Die Messung der Extinktion erfolgte am Bio-Photometer der Firma Eppendorf (Hamburg) bei 260 nm und 280 nm. Als Referenz dienten 62 µl H₂O. Der Reinheitsgrad wurde mit Hilfe des Quotienten aus E₂₆₀/E₂₈₀ kontrolliert. Dieser sollte im Mittel bei ca. 1,8 liegen. Sofern eigene Proben eine signifikante Abweichung zeigten, wurden diese erneut aufgereinigt.

2.2. Amplifizierung der Plasmide

2.2.1 Transformation kompetenter Zellen

Für die Amplifizierung von DNA-Plasmiden können kompetente Zellen verwendet werden. Diese sind Bakterien, die durch eine Behandlung mit Calciumchlorid in der Lage sind, fremde DNA aufzunehmen und zu vervielfältigen. Für die Transformation wurden bei -80°C in Calciumchlorid-Glycerol-Lösung gelagerte DH5α-Zellen (Stratagene, La Jolla, USA) verwendet. 100 µl der Lösung wurden auf Eis aufgetaut und im Anschluss mit 20 µl des Ligationsansatzes für 30 min auf Eis inkubiert. Zur Aufnahme des Plasmids in die Zelle wurde der Ansatz für 1 min auf 42°C erhitzt und anschließend für 2 min erneut auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl 37°C warmen LB-Mediums erfolgte eine erneute Inkubation für 1 Std bei 37°C auf dem Schüttler. Um ein selektives Wachstum sicher zustellen, wurden die transformierten Bakterien auf Ampicillin-haltigen LB-Agar ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Aufgrund eines Ampicillin-Resistenzgens im Plasmid kam es nur zum Wachstum von erfolgreich transformierten Bakterien.

Calciumchlorid-Lösung	50 mM CaCl ₂ 15% Glycerin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
LB-Agar	32 g/l in purifiziertem H ₂ O	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Antibiotikum-haltiger LB-Agar	100 µg/ml Ampicillin bzw. in LB-Agar	Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

2.2.2 Mini-Präparation

Die Plasmid-Präparation dient zur Isolierung von amplifizierten Plasmiden aus Bakterien. Eine Mini-Präparation ermöglicht die Isolierung von ca. 20 µg Plasmid-DNA.

Nach der Transformation wurden drei Bakterienkolonien vom LB-Agar in je 5 ml Antibiotika-haltiges LB-Medium überführt und für 16 Std bei 37°C amplifiziert.

Die Mini-Präparation wurde anschließend mit Hilfe des Nucleo Spin Plasmid Kit der Firma Macherey-Nagel (Düren) nach Protokoll durchgeführt. Hierfür wurde das Amplifikat für 15 min bei RT und 4000 rpm zentrifugiert und der klare Überstand verworfen. Zur Lyse der Bakterienzellen erfolgte zunächst die Resuspendierung des Pellets in 250 µl A1-Puffer. Darauf wurde 250 µl A2-Puffer und nach 5-minütiger Inkubation bei RT 300 µl A3-Puffer hinzugefügt. Der Zelldetritus wurde durch Zentrifugation für 5 min bei 11000 rpm vom klaren Überstand getrennt, sodass der Überstand auf eine mitgelieferte Plasmidsäule geladen konnte. Nach einer Zentrifugation bei 11000 rpm für 1 min erfolgte ein Waschschriff mit 600 µl A4-Puffer. Dieser wurde durch zweimalige Zentrifugation bei 11000 rpm, zunächst für 1 und im Anschluss für weitere 2 min, wieder entfernt. Durch Zugabe von 50 µl AE-Puffer mit anschließender Zentrifugation bei 11000 rpm für 1 min erfolgte die Elution der DNA. Die Plasmid-DNA wurde bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

LB-Medium	20 g/l in purifiziertem H ₂ O	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
------------------	--	----------------------------

2.2.3 Maxi-Präparation

Über eine Maxi-Präparation kann ca. 500 µg Plasmid-DNA aus transformierten E.coli Bakterien isoliert werden. Hierfür wurden die Bakterien zunächst im folgenden Ansatz für 16 Std bei 37°C unter leichten Schüttelbewegungen amplifiziert:

300 ml LB-Medium

300 µl Ampicillin bzw. 600 µl Kanamycin

ca. 15 µl des Glycerol-Stock.

Die Isolierung der DNA aus den Bakterien erfolgte mit dem QIAfilter Plasmid Maxi-Präparations-Kit von der Firma QIAGEN (Hamburg) nach dem beigefügten Protokoll und den mitgelieferten Puffern.

Der Ansatz wurde zunächst für 15 min bei 4000 rpm in der Megafuge 1.0 R der Firma Thermo Scientific (Waltham, USA) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde verworfen und das Pellet zur Lyse in 10 ml P1-Puffer resuspendiert. Des Weiteren wurden 10 ml P2-Puffer und nach einer 5-minütigen Inkubation 10 ml P3-Puffer hinzugefügt. Nach einer weiteren Inkubation für 20 min auf Eis wurde der Zelldetritus durch Zentrifugation bei 15000 rpm für 10 min und 4°C abgetrennt. Der Überstand wurde auf eine mitgelieferte QIAGEN-Tip 500 Säule überführt. Die durchgelaufene Flüssigkeit wurde verworfen und die Säule im Anschluss

zweimal mit QC-Puffer gewaschen. Darauf wurde die DNA mit 15 ml QF-Puffer eluiert. Zur Aufreinigung der DNA wurde diese zunächst mit 10,5 ml Isopropanol ausgefällt. Nach einer Zentrifugation für 30 min und 4°C bei 15000 rpm wurde der Überstand verworfen und 5 ml Ethanol zu dem Pellet hinzugefügt. Nach der Resuspension wurde für weitere 10 min mit den oben genannten Bedingungen zentrifugiert. Das dabei entstandene Pellet wurde in 800 µl 10 mM Tris pH 8,0 gelöst und dazu 80 µl 3 M NaAc pH 7,2 sowie 900 µl 100%iger Ethanol hinzugefügt. Es folgte eine weitere Zentrifugation für 5 min bei 13000 rpm bei RT. Der Überstand wurde ein weiteres Mal verworfen und das Pellet in 1000 µl 70%igem Ethanol gelöst. Es schloss sich eine letzte Zentrifugation für 3 min bei 13000 rpm bei RT an. Das DNA-Pellet wurde in 200 µl 10 mM Tris pH 8,0 gelöst und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert.

Um die Anwesenheit des Inserts in der Klonierungsstelle des Plasmidvektors zu überprüfen, erfolgte ein Restriktionsverdau mit den entsprechenden Endonukleasen nach der Maxi- und Mini-Präparation.

2.2.4 Anlegungen eines Glycerol-Stocks

Um transformierte Bakterien noch für spätere Maxi-Präparationen verwenden zu können, wurden diese bei –80°C in Glycerol-haltigem LB-Medium kryokonserviert.

Glycerol-Stock	850 µl Bakterienkultur 150 µl Glycerol	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
-----------------------	---	----------------------------

2.3 Zelllinien

2.3.1 HEK293-Zellen

HEK293-Zellen stammen von humanen embryonalen Nierenzellen ab, die mit Adenovirus-Typ-5-Fragmenten immortalisiert wurden (Graham et al. 1977). Die Zellen wachsen Fibroblasten-artig als Monolayer und exprimieren neben Zytokeratinen und Vimentin auch Neurofilamente.

2.3.2 CSM14.1-Zellen

Bei CSM14.1-Zellen handelt es sich um nigro-striatale Rattenzellen, die durch die Einführung eines temperatursensitiven SV40-large-T-Antigens immortalisiert wurden (Durand et al. 1990).

2.3.3 SH-SY5Y-Zellen

SH-SY5Y-Zellen sind humane Neuroblastomzellen. Sie sind als klonale Sublinie aus der Neuroepitheliomzelllinie SK-N-SH hervorgegangen, die 1970 aus der Knochenmarkbiopsie eines vierjährigen Mädchens mit metastasierendem Neuroblastom isoliert wurden (Biedler et al. 1973). SH-SY5Y-Zellen wachsen Epithel-artig als Monolayer und exprimieren sowohl Neurofilamente als auch Vimentin.

2.4 Zellkultur

2.4.1 Kultivierung

HEK293- und CSM14.1-Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in 10 cm Rundschaalen der Firma Greiner Bio-One (Frickenhausen) in DMEM Kulturmedium bei 5% CO₂, Wasserstoff-gesättigter Atmosphäre und 37°C bzw. 32°C kultiviert.

Kulturmedium	DMEM (4,5 g/l Glucose) mit L-Glutamin und Natrium-Pyruvat	PAA (Pasching, Österreich)
	100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin	PAA (Pasching, Österreich)
	10% FCS gold	PAA (Pasching, Österreich)

SH-SY5Y wurden bei 37°C, 5% CO₂ und Wasserstoff-gesättigter Atmosphäre kultiviert, jedoch in einem speziellen SH-SY5Y-Kulturmedium.

SH-SY5Y-Kulturmedium	DMEM (4,5 g/l Glucose) mit L-Glutamin und Natrium-Pyruvat	PAA (Pasching, Österreich)
	100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin	PAA (Pasching, Österreich)
	15% FCS gold	PAA (Pasching, Österreich)

2.4.2 Passagierung

Die konfluenten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen einmal mit 2 ml PBS gewaschen. Zur Lösung der Zellen von der Rundschaale wurden CSM14.1-, HEK293- und SH-SY5Y-Zellen mit 1 ml Trypsin für 15 min bei 32°C (CSM14.1-Zellen) bzw. für 5 min bei 37°C (HEK293- und SH-SY5Y-Zellen) inkubiert. Das Trypsin wurde anschließend mit 2 ml Kulturmedium neutralisiert.

Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation der Zellsuspension in der Zentrifuge 5810 der Firma Eppendorf (Hamburg) für 5 min bei 1200 rpm und RT. Das Zellpellet wurde in 1 ml

des jeweiligen Kulturmediums resuspendiert und im Verhältnis 1:5 auf eine neue Rundschale ausplattiert.

1x Trypsin	10x Trypsin 1:10 in PBS	PAA (Pasching, Österreich)
PBS (pH 7,4)	40 g NaCl 1 g KCl 3,8 g Na ₂ HPO ₄ *2 H ₂ O 1 g KH ₂ PO ₄	Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Merck (Darmstadt)

2.4.3 Quantifizierung der Zellen

Um für die einzelnen Experimente replizierbare Zellzahlen einzusetzen, erfolgte eine Auszählung vor dem Ausplattieren in einer Neubauer-Zählkammer. Hierfür wurden die Zellen wie beim Passagieren von den Kulturschalen gelöst. Nach der Zentrifugation wurde 25 µl der Zellsuspension 1:10 mit Zählmedium verdünnt. Die Zählkammer wurde mit 10 µl dieser Dilution gefüllt.

Die ermittelte Zellzahl wurde auf einen Milliliter hochgerechnet und die gewünschte Zellzahl auf die entsprechende Zellkulturplatten ausgesät.

Zählmedium	50% Trypan Blue Solution (0,4%) in PBS	Sigma Aldrich (Steinheim)
-------------------	---	---------------------------

2.4.4 Einfrieren der Zellen

Die Zellen wurden, wie in 2.4.2 beschrieben, von den Rundschalen gelöst und bei 1200 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Einfriermedium resuspendiert. Die Suspension wurde bei -80°C kryokonserviert.

Einfriermedium	10% DMSO in FCS gold	Sigma-Aldrich (Steinheim)
-----------------------	-------------------------	---------------------------

2.4.5 Auftauen der Zellen

Die eingefrorenen Zellen wurden im Wasserbad bei 37°C erwärmt. Die im Einfriermedium gelösten Zellen wurden in 5 ml Medium aufgenommen und im Anschluss bei 1200 rpm für 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet anschließend in 1 ml des zellspezifischen Mediums resuspendiert und auf eine 10 cm Rundschale ausplattiert.

2.4.6 Transfektion

Als Transfektion versteht man das Einschleusen von genetischem Material in eine eukaryotische Zelle. Es wurden ausschließlich transient transfizierte Zellen verwendet. Hierbei wird ein Plasmidring nur temporär in eine Wirtszelle eingebracht und dort vermehrt abgelesen.

Bei CSM14.1- und HEK293-Zellen wurden 5×10^5 Zellen pro well und bei SH-SY5Y- Zellen 10^6 Zellen pro well auf eine 6-well-Platte Cellstar® der Firma Greiner Bio-One (Frickenhäusen) ausplattiert. Die Transfektion wurde mit Hilfe des Transfektans Lipofektamine™ 2000® der Firma Invitrogen (Darmstadt) nach Protokoll durchgeführt. Für die Transfektion einer 6-well-Platte wurde 2 µg DNA pro Vektor und 9 µl Lipofektamine getrennt in je 250 µl Optimem (Invitrogen, Darmstadt) für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die beiden Ansätze zusammengegeben und für weitere 20 min bei RT inkubiert (Die Mengenangaben beziehen sich jeweils auf ein well). Vor Zugabe des Transfektionsgemisches zu den Zellen erfolgte bei CSM14.1- und HEK293-Zellen ein Mediumtausch des zellspezifischen Mediums durch je 2 ml Serum- und Antibiotika-freiem Kulturmediums. Bei der Transfektion von SH-SY5Y-Zellen wurde das Medium durch 2 ml Optimem ersetzt. Nach 4-stündiger Inkubation bei 37°C bzw. 32°C und 5% CO₂ erfolgte ein erneuter Mediumtausch hin zum zellspezifischen Kulturmedium. Insgesamt 24 Std nach der Transfektion (HEK293- und CSM14.1-Zellen) bzw. 36 Std bei SH-SY5Y-Zellen wurden diese geerntet.

2.5 Proteinanalyse

2.5.1 Herstellung von zellulären Lysaten mit Triton-X-100

Die Lyse von Zellen dient der Isolierung von zellulär exprimierten Proteinen. Die isolierten Proteine der Zelllysate können in nachfolgenden Analysen spezifisch untersucht werden.

Zur Lyse transfizierter HEK293-, CSM14.1- oder SH-SY5Y-Zellen wurden 80-90% konfluente 6-well-Platten dreimal mit 1 ml eiskaltem PBS gewaschen. Mit einem Zellschaber wurden die Zellen von der Platte gelöst und im Anschluss für 5 min bei 7500 rpm und 4°C zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde mit 50-70 µl Lysepuffer versetzt. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Sonifizierung für 30 sec und eine Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min bei 4°C. Der proteinhaltige Überstand wurde bis zur weiteren Analyse bei -20 °C gelagert.

Lysepuffer	2,5 ml TBS 25 µl Triton-X-100 100 µl Proteinase-Inhibitor	Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
TBS	150 mM NaCl 50 mM Tris	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

2.5.2 Herstellung von zellulären Lysaten mit Harnstoff

Für die Zelllyse mit Harnstoff wurden konfluente HEK293-Zellen wie in 2.5.1 beschrieben von der 6-well-Platte gelöst und zentrifugiert. Zu dem Zellpellet wurde je 200 µl Harnstoff-Lysepuffer hinzugefügt. Der Puffer wurde für 15 min inkubiert und das Lysat für 30 sec sonifiziert. Zur Analyse mittels Western Blot wurden 10% des Lysats mit 6x SDS-Ladepuffer versetzt, 5 min bei 95°C aufgekocht und auf ein SDS-Gel geladen.

Harnstoff-Lysepuffer	8M Harnstoff in H ₂ O pH 8,0 100 µl Proteinase-Inhibitor	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
-----------------------------	--	----------------------------

2.5.3 Subzelluläre Fraktionierung

Durch das ProteoExtract Subcellular Proteome Extraction Kit (CalbioChem, Nottingham, UK) ist es möglich Proteine aus dem Zytoplasma, der Membran bzw. den Organellen, dem Nukleus und dem Zytoskelett zu extrahieren und getrennt von einander zu untersuchen. Die Fraktionierung wurde nach dem mitgelieferten Protokoll durchgeführt.

Hierfür wurde für Fraktion I (Zytoplasma) 80 -100 µl Extraktion-Puffer I mit 1/6 µl Protease-Inhibitor vermischt (alle Angaben beziehen sich auf eine Probe). Das Zellpellet wurde in dieser Lösung resuspendiert und für 10 min auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Nach der Zentrifugation (8 min, 10000 rpm, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Das übrig gebliebene Pellet wurde für Fraktion II (Membran und Organellen) mit einem Gemisch aus 80-100 µl Extraktion-Puffer II und 1/6 µl Protease-Inhibitor resuspendiert und im Anschluss für 30 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Lösung wurde zentrifugiert (8 min, 10000 rpm, 4°C) und der Überstand wieder in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Um Proteine aus dem Nukleus zu extrahieren (Fraktion III) wurde 40-50 µl Extraktion-Puffer III mit 1/6 µl Protease-Inhibitor und 1/12 µl Benzonase gemischt und das Zellpellet in dieser Lösung resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation bei 4°C auf dem Drehrad erfolgte eine Zentrifugation wie oben beschrieben und Überführung des Überstandes in ein neues Eppendorf-Tube. Für die vierte Fraktion (Zytoskelett) wurden das Zellpellet mit 40-50 µl Extraktion-Puffer IV und 1/6 µl Protease-Inhibitor erneut resuspendiert.

Abschließend wurde für 10 min bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.5.4 Proteinkonzentrationsbestimmung mittels BCA

Die Proteinkonzentration der zellulären Lysate wurde mit Hilfe des BCATM Protein Assay Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) bestimmt. Bei dem BCA Assay kommt es zu einem Farbumschlag aufgrund der sogenannten Biuret-Reaktion (Cu^{2+} wird durch Proteine zu Cu^{1+} reduziert). Durch die Bildung eines Chelatkomplexes von zwei Molekülen BCA (Bicinchonin-Säure) und einem reduzierten Kupferion entsteht eine lila Färbung. Für den BCA Assay wurde auf einer 96-well-Platte (Greiner Bio-One, Frickenhausen) je 2 µl der Lysatproben in je 200 µl BCA-Reagenz (Mischungsverhältnis 50:1) für 30 min bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Als Konzentrationsstandard dienten verschiedenen BSA-Proteinmengen (40 µg, 20 µg, 10 µg, 5 µg, 2,5 µg, 1,25 µg und 0,625 µg). Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Doppelbestimmung. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm am Rainbow-ELISA-Photometer der Firma TECAN (Männedorf, Schweiz) unter Verwendung des Computerprogramms Magellan 3. Die Proteinkonzentration wurde anhand der Eichgerade der BSA-Konzentrationsreihe ermittelt.

BCA-Färbelösung	2% Reagenz B in Reagenz A	
Reagenz A	enthält Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat, BCA und Natriumtartrat in 0,1 M Natriumhydroxid	
Reagenz B	enthält 4% Kupfersulfat	
BSA	10 µg/µl in Lysepuffer	Sigma-Aldrich (Steinheim)

2.5.5 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung und Detektion der jeweiligen Zielproteine wurde eine Kombination aus SDS-PAGE und anschließendem Western Blot durchgeführt.

Die SDS-PAGE dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht durch Anlegung eines elektrischen Feldes. Hierfür wurde das Mini-PROTEAN[®] 3-cell-System der Firma Bio-Rad (Hercules, USA) verwendet. Zunächst wurde ein SDS-Polyacrylamidgel hergestellt, bestehend aus einem 5%igen Sammelgel und einem 12%igen Trenngel. Vor dem Auftragen der Proben in die Geltaschen wurden 15 µg Protein im Verhältnis 5:1 mit 6x SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95°C im ThermoStat plus der Firma Eppendorf (Hamburg) gekocht. Als Marker wurden 4 µl Page ruler der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet.

Der Gellauf wurde zunächst bei 80 V und nach Erreichen des Trenngels bei 120 V solange durchgeführt, bis die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte (ca. 1,5 Std).

5%iges Sammelgel (Angaben für ein 0,75 mm Gel)	12%iges Trenngel (Angaben für ein 0,75 mm Gel)	
0,68 ml purifiziertes H ₂ O 0,17 ml 30% Acrylamid 0,13 ml 1 M Tris (pH 6,8) 0,01 ml 10 % SDS 0,01 ml 10 % APS 0,001 ml TEMED	1,60 ml purifiziertes H ₂ O 2,00 ml 30% Acrylamid 1,30 ml 1,5 M Tris (pH 8,8) 0,05 ml 10 % SDS 0,05 ml 10 % APS 0,002 ml TEMED	Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Merck KGaA (Darmstadt) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

Laufpuffer	250 mM Tris 1,9 M Glycin 1% SDS	AppliChem GmbH (Darmstadt) AppliChem GmbH (Darmstadt) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
4x Tris Cl/SDS, pH 6,8	0,5 M Tris 0,4% SDS	AppliChem GmbH (Darmstadt) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
4x Tris Cl/SDS, pH 8,8	1,5 M Tris 0,4% SDS	AppliChem GmbH (Darmstadt) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
6x SDS Ladepuffer	7 ml 4x Tris Cl/SDS pH 6,8 3 ml Glycerol 0,1% SDS 0,93 g DTT 1,2 mg Bromphenolblau	Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Carl Roth GmbH (Karlsruhe) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

2.5.6 Western Blot

Im Western Blot werden Proteine nach der SDS-PAGE durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Membran übertragen und im Anschluss durch Antikörper spezifisch nachgewiesen.

Der Proteintransfer erfolgt bei 350 mA, 100 V und 4°C für 1,5- 2 Std in der Nass-Blotkammer Mini-PROTEAN[®] der Firma Bio-Rad (Hercules, USA). Die Proteine wurden dabei auf eine 6x9 cm große Nitrocellulosemembran (AppliChem GmbH, Darmstadt) transferiert. Im Anschluss an den Blot wurden unspezifische Antikörperbindungsstellen durch Inkubation der Membran für 1 Std in Milchlösung blockiert. Daraufhin erfolgte die Inkubation des Primärantikörpers, der in Milchlösung im Verhältnis 1:1000 gelöst wurde, bei 4°C über Nacht. Nach dreimaligem Waschen für 20 min mit TBS-T erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen an HRP (Horseradish-Peroxidase)-konjugierten Sekundärantikörper (Verdünnung 1:2000) für 1 Std bei RT auf dem Drehrad. Zum Schluss erfolgten erneut drei 20-minütige Waschschrte mit TBS-T.

Transferpuffer	25 mM Tris 192 mM Glycin 20% Methanol	AppliChem GmbH (Darmstadt) AppliChem GmbH (Darmstadt) Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Milchlösung	5% Milchpulver in TBS-T	AppliChem GmbH (Darmstadt)
10x TBS-T	24,2 g Tris 80 g NaCl 1 ml Tween 20 (0,1%) ad 1 l H ₂ O	AppliChem GmbH (Darmstadt) Carl Roth GmbH (Karlsruhe) AppliChem GmbH (Darmstadt)

2.5.7 Immunodetektion der Proteine

Die gebundenen Sekundärantikörper wurden mit Hilfe eines ECL-Detektionsreagens nachgewiesen. Zur Herstellung des ECL-Reagens wurden ECL-Lösung 1 und ECL-Lösung 2 im Verhältnis 1:1 vermischt und für 2 min auf der Nitrozellulosemembran inkubiert. ECL reagiert als Substrat der HRP, unter Bildung von Chemolumineszenzsignalen, die auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht werden können.

ECL-Lösung 1	100 µl Luminol (250 mM in DMSO) 44 µl Coumarsäure (90 mM in DMSO) 1 ml 1M Tris pH 8,5 8,85 ml H ₂ O	Sigma Aldrich (Steinheim) Sigma Aldrich (Steinheim)
ECL-Lösung 2	6 µl H ₂ O ₂ 1 ml 1 M Tris pH 8,5 9 ml H ₂ O	Merck KGaA (Darmstadt)

2.5.8 Coomassie-Färbung

Zur Qualitätskontrolle des Western Blots wurde das Gel mit einer Coomassie-Lösung gefärbt. Diese Lösung färbt unspezifisch die noch im Gel vorhandenen Proteine an. Hierfür wurde das Gel für 15 min mit der Coomassie-Lösung auf dem Schüttler inkubiert und im Anschluss für ca. 2 Std mit 10%iger Essigsäure wieder entfärbt.

Coomassie-Lösung	25% Isopropanol 10% Essigsäure 0,05% Coomassie-Brilliantblau in H ₂ O	Merck kGaA (Darmstadt)
-------------------------	---	------------------------

2.5.9 Dot Blot

Vergleichbar mit dem Western Blot dient der Dot Blot zur Detektion und Analyse von Proteinen. Hierbei werden jedoch die Proteinproben direkt punktförmig auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Es erfolgt also keine elektrophoretische Auftrennung der

Größe nach. Bei dieser Methode können Proteinkonzentrationen semiquantitativ bestimmt und insbesondere höhermolekulare Proteinaggregate detektiert werden.

Für den Dot Blot wurden Zellen wie in 2.4.6 beschrieben ausplattiert und transfiziert. Die Lyse erfolgte mit 50-70 µl Triton-X-100-Lysepuffer für 15 min auf Eis. Anschließend wurde für 10 min bei 9000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde zur Analyse mittels Western Blot verwendet. Das Pellet wurde erneut mit 50 µl Lysepuffer versetzt und für 10 sec sonifiziert. 20 µg Protein wurde mit H₂O auf ein Gesamtvolumen von 250 µl eingestellt, mit 6x Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben in die Vertiefungen der Dot-Blot-Kammer Minifold 1 der Firma Schleicher und Schuell (Dassel) geladen und durch Erzeugung eines Unterdrucks auf die Nitrozellulosemembran geblottet. Die Membran wurde anschließend einmal mit H₂O gewaschen. Die weiteren Schritte entsprechen denen des Western Blots (s. 2.5.5). Die Proteine wurden ebenfalls mittels ECL-Reagenz detektiert, jedoch mit Hilfe des Fluor-STM MultiImagers (Bio-Rad, Hercules, USA) digitalisiert.

6x Ladepuffer	7,0 ml Tris/SDS pH 6,8 3 ml Glycerol 1,2 g SDS 0,46 g DTT	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
----------------------	--	----------------------------

2.6 Antikörper

2.6.1 Primär-Antikörper

Substrat	Verdünnung	Isolierung aus	Firma
α-Aktin	WB: 1:1000 IF: 1:750	mouse monoklonal	BD Bioscience Pharmingen (San Diego, USA)
α-BAG1	WB: 1:2000 IF: 1:750	rabbit polyklonal	C. Reed (La Jolla, USA)
α-β-Tubulin	WB: 1:1000 IF: 1:750	mouse monoklonal	Sigma-Aldrich (Steinheim)
α-Cadherin	WB: 1:2000	mouse monoklonal	Sigma-Aldrich (Steinheim)
α-CDCrel-1	WB: 1:1000	mouse monoklonal	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
α-HA	WB: 1:1000	mouse monoklonal	Convance (Princeton, USA)
α-Histon H2B	WB: 1:2000	mouse monoklonal	Abcam (Cambridge, USA)
α-Parkin	WB: 1:1000 IF: 1:750	rabbit polyklonal	Cell Signaling (Boston, USA)
α-Ubiquitin	WB: 1:1000	mouse monoklonal	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
α-Vimentin	WB: 1:2000	mouse monoklonal	Sigma-Aldrich (Steinheim)

Tab. 2.2.: Verwendete Primärantikörper. WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz

2.6.2 Sekundär-Antikörper

Substrat	Verdünnung	Isolierung aus	Firma
Cy3-konjugierter α-mouse	IF: 1:500	Goat monoklonal	Dianova (Hamburg)
Cy3-konjugierter α-rabbit	IF: 1:500	Goat polyklonal	Dianova (Hamburg)
α-Mouse	WB: 1:2000	Goat monoklonal	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)
α-Rabbit	WB: 1:2000	Goat polyklonal	Santa Cruz (Santa Cruz, USA)

Tab. 2.3. : Verwendete Sekundärantikörper. WB: Western Blot, IF: Immunfluoreszenz

2.7 Immunozytochemie

Für die Immunozytochemie wurde eine 24-well-Platte mit autoklavierten Cover-Slips bestückt und 10^4 Zellen CSM14.1- bzw. 2×10^4 SHSY-5Y-Zellen pro well ausplattiert. 1 µg DNA pro Vektor und 3 µl Lipofektamine pro well wurden für die Transfektion getrennt in je 50 µl Optimem für 5 min bei RT inkubiert. Das Lipofektamine-Gemisch wurde im Anschluss zu der DNA-Lösung hinzugefügt und nach einer 20-minütigen Inkubation auf die Zellen gegeben. 24 Std nach der Transfektion und anschließender Inkubation bei 37°C bzw. 32°C und 5% CO₂ erfolgte die Fixierung der Zellen durch 150 µl einer 4%igen Paraformaldehydlösung in PBS für 15 min bei RT. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten unter Lichtschutz. Nach der Fixierung wurde einmal mit PBS gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 0,1% Saponine in PBS für 15 min bei RT unter leichten Schüttelbewegungen permeabilisiert. Nach einem weiteren Waschschriff mit PBS erfolgte zur Blockierung unspezifischer Antikörperbildungen die Zugabe von 150 µl *Blocking solution* für 60 min bei RT. Im Anschluss wurden die Zellen mit dem Primärantikörper inkubiert. Dieser wurde in einer Konzentration von 1:750 in *Blocking solution* gelöst und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler inkubiert. Vor der Inkubation der Zellen mit dem Sekundärantikörper erfolgten drei Waschschriffe mit PBS für 20 min. Der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte Antikörper wurde in Verhältnis 1:500 in *Blocking solution* verdünnt und für eine Std bei RT inkubiert. Nach drei weiteren 20-minütigen Waschschriffen mit PBS erfolgte eine Anfärbung der Nuklei mit Hilfe der *DAPI-working solution* für 2-3 min auf dem Schüttler bei RT und anschließend noch ein Waschung für 2 min mit PBS. Zum Fixieren der Cover-slips auf einem Objektträger wurde Mowiol als Eindeckmedium verwendet. Nach der Trocknung über Nacht erfolgte die Analyse der Zellen am Axioplan 2 imaging-Fluoreszenzmikroskop von der Firma Zeiss (Jena) bei entsprechenden Filtereinstellungen (Cy3, EGFP, DAPI). Als Negativ-Kontrolle wurde für jede Bedingung ein Cover-Slip ohne den Primärantikörper, nach sonst gleichem Protokoll, aufbereitet.

Fixierungsmedium	4% PFA in PBS	Carl Roth GmbH (Karlsruhe)
Permeabilisierungs-Medium	0,05 g Saponine in 50 ml TBS	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Blocking solution	1,5 g Albumin in 50 ml TBS	AppliChem GmbH (Darmstadt)
DAPI working-Solution	2 µg/ml in PBS	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Mowiol		Carl Roth GmbH (Karlsruhe)

2.7.1 Auszählung der Parkin-Aggregate

Zur Beurteilung des Aggregationsverhaltens von Parkin bei verschiedenen Konditionen erfolgte eine Auszählung der Zellen mit Hilfe des Axioplan 2 imaging-Fluoreszenzmikroskop von der Firma Zeiss (Jena) bei 40-facher Vergrößerung. Für jede Kondition wurden je drei Cover-Slips mit transfizierten CSM14.1-Zellen mäanderförmig unter dem jeweiligen Filter untersucht und Zellen mit 1 oder mehreren sichtbaren Aggregaten gezählt. Diese wurden in Relation zu allen transfizierten Zellen gesetzt. Nur doppeltransfizierte Zellen wurden berücksichtigt.

2.8 Co-Immunopräzipitation (Co-IP)

Mittels einer Co-Immunopräzipitation (Co-IP) lassen sich Protein-Interaktionen nachweisen. Hierfür werden spezielle Beads benötigt. Das sind Agarose-Kugeln, an denen ein Antikörper gebunden ist. Dieser richtet sich gegen eines der interagierenden Proteine. Mittels einer Präzipitation durch Zentrifugation werden diese Beads mit den gebundenen Proteinen isoliert und können im Anschluss im Western Blot analysiert werden. Hierbei richtet sich der verwendete Primärantikörper gegen das andere interagierende Protein.

2.8.1 FLAG-Co-IP

Für die Co-IP mit FLAG-Beads wurde auf einer 6-well-Platte ca. 5×10^5 HEK293-Zellen ausplattiert. Die Zellen wurden mit FLAG-getaggten BAG1- bzw. Parkin-Plasmiden und Parkin-, BAG1-, BAGAC bzw. pcDNA-Leervektor (LV)-Plasmiden cotransfiziert. Zunächst erfolgte die Zelllyse mit je 80 µl RIPA (*Radioimmunoprecipitation assay*)-Puffer pro well. Das Lysat wurde für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C und 7500 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach der Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA wurde 100-200 µg Protein auf ein Volumen von 250 µl mit RIPA-Puffer eingestellt. Ein Teil des Lysats wurde direkt zur Analyse mittels Western Blot verwendet.

Pro Probe wurden 15 µl der FLAG-Bead-Suspension in ein Eppendorf-Tube überführt und dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen. Die Beads wurden im Anschluss mit dem Zelllysats vermischt und für 3 Std bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine Zentrifugation bei 4°C und 7500 rpm für 5 min. Der Überstand wurde für weitere Analysen verwendet. Die proteingekoppelten Beads wurden erneut dreimal mit RIPA-Puffer gewaschen. Nach dem letzten Waschgang wurde 30 µl 2x SDS-Puffer zu den Beads hinzugefügt und für 5 min bei 95°C erhitzt, um das präzipitierte Protein zu eluieren.

Im Anschluss erfolgte eine Analyse mittels Western Blot.

RIPA-Puffer	20 mM Tris pH 7,5 150 mM NaCl 1% Nonidet P-40 0,5% Natrium-Deoxycholate 1 mM EDTA 0,1% SDS	AppliChem GmbH (Darmstadt) Merck kGaA (Darmstadt)
--------------------	---	--

Red Anti-FLAG[®]M2 Affinity Gel	Sigma-Aldrich (Steinheim)
---	---------------------------

2.8.2 HA-Co-IP

Bei diesen Co-IP-Versuchen richtet sich der Antikörper gegen das Signalpeptid Hämagglutinin (HA). Auf einer 6-well-Platte wurden 5×10^5 HEK293-Zellen ausplattiert und mit HA-CDCrel-1-, Parkin-, BAG1-, BAGAC- bzw. LV-Plasmiden cotransfiziert.

Die Co-Immunopräzipitation erfolgte nach dem mitgelieferten Protokoll und mit den beigegeführten Puffern.

Zunächst wurden die Zellen mit 300 µl Lysepuffer versetzt und für 15 min bei 4°C inkubiert. Nach einer 15-minütigen Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Tube überführt. Das Zelllysats, sowie 300 µl 1x IP-Puffer und 10 µl HA-Agarose-Beads wurden in eine mitgelieferte Spin column überführt und über Nacht auf dem Drehrad bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten 6 Waschgänge mit je 700 µl 1x IP-Puffer und einer anschließenden Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 sec. Ein letzter Waschgang wurde mit 1x PBS durchgeführt. Die Beads wurden in 40 µl 1x SDS-Ladepuffer gelöst. Im Anschluss wurden die Proteine durch das Aufkochen für 5 min bei 95°C von den Beads gelöst. Die weitere Analyse der Proteine erfolgte mittels Western Blot.

Anti-HA Immunopräzipitation Kit	Sigma-Aldrich (Steinheim)
--	---------------------------

2.9 Quantifizierung des Proteinumsatzes

2.9.1 Cycloheximid-Experimente

Cycloheximid ist ein Antibiotikum, welches die eukaryontische Proteinsynthese hemmt. Durch die Inhibition der 60S-Untereinheit der Ribosomen wird die gesamte Proteinneusynthese auf Translationsebene blockiert. Da Proteine weiter über das Proteasom degradiert werden, ist es möglich den zeitlich Verlauf des Abbaus von Zielproteinen zu verfolgen. Es besteht so die Möglichkeit die Halbwertszeit von Proteinen zu bestimmen.

Für die Cycloheximidexperimente wurden HEK293- und CSM14.1-Zellen wie in 2.4.6 ausplattiert und transfiziert. 17 Std nach der Transfektion erfolgte nach einem Mediumwechsel die Zugabe von 20 µg/ml Cycloheximid. Um den Proteinabbau zu verfolgen, wurden die Zellen nach verschiedenen Zeitpunkten geerntet und im Anschluss mittels Western Blot analysiert.

Cycloheximid	100 mg/ml in DMSO	Sigma-Aldrich (Steinheim)
---------------------	-------------------	---------------------------

2.9.2 Proteasom-Inhibitor MG 132

Blockiert man den proteasomalen Abbau ubiquitinylierter Proteine in der Zelle durch Zugabe eines Proteasom-Inhibitors, werden diese Proteine in der Zelle aufgestaut und können als hochmolekulare Banden im Western Blot nachgewiesen werden.

Für diese Experimente wurden HEK293-Zellen wie in 2.4.6 beschrieben ausplattiert und transfiziert. 12 Std nach Transfektion erfolgte die Zugabe des Proteasom-Inhibitors MG 132 in einer Konzentration von 20 µM. Nach erneuter Inkubation für 12 Std wurden die Zellen geerntet, lysiert und im Anschluss mittels Western Blot analysiert.

MG 132	10 mM in 50% DMSO und PBS	Sigma Aldrich (Steinheim)
---------------	---------------------------	---------------------------

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis der Interaktion zwischen Parkin und BAG1

3.1.1 Co-Immunopräzipitation von Parkin und BAG1 in HEK293-Zellen

Um eine Interaktion zwischen Parkin und BAG1 darzustellen, wurden zunächst Co-Immunopräzipitations-Versuche durchgeführt. Hierfür wurde Parkin mit FLAG-BAG1 transient in HEK293-Zellen überexprimiert. Unter Einsatz eines gegen den FLAG-tag gerichteten Antikörpers erfolgte die Präzipitation von FLAG-BAG1.

Bei der anschließenden Western-Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen Parkin zeigte sich ein spezifisches, positives Signal passender Größe. Bei einer Überexpression von FLAG-BAG1 mit pcDNA-Leervektor (pcDNA-LV) sowie Parkin mit pcDNA-LV konnte in derselben Zellreihe dagegen kein Signal detektiert werden (s. Abb. 3.1 oben).

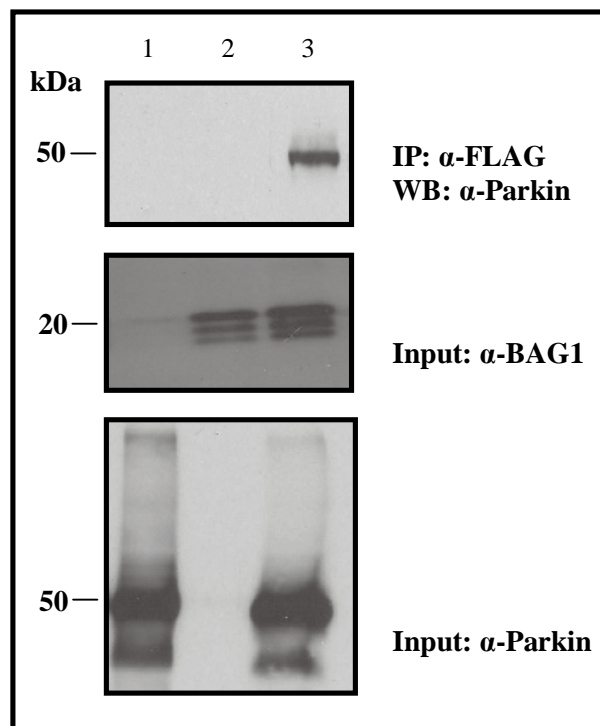


Abb. 3.1: Immunoblot nach Überexpression von Parkin und FLAG-BAG1 in HEK293-Zellen. Überexprimiertes FLAG-BAG1 wurde über FLAG-Beads präzipitiert. Anschließend wurde im Western Blot Parkin detektiert (oben). Zur Kontrolle der Expression wurden das Voll-Lysat (Input) mit Parkin- und BAG1-Antikörpern analysiert (unten). 1: Parkin+pcDNA-LV; 2: pcDNA-LV+FLAG-BAG1; 3: Parkin+FLAG-BAG1.

In einem zweiten experimentellen Ansatz erfolgte eine Überexpression von FLAG-Parkin und BAG1 mit anschließender Präzipitation über den FLAG-tag. Auch bei dieser Konstellation konnte eine Proteininteraktion über die Darstellung einer spezifischen BAG1-Bande im Western Blot nachgewiesen werden (s. Abb. 3.2 oben). Unspezifische Bindungen über den FLAG-tag konnten somit ausgeschlossen und eine Interaktion zwischen Parkin und BAG1 bei

Überexpression in HEK293-Zellen dargestellt werden. Diese Interaktion konnte auch in der neuronalen CSM14.1-Zellreihe bestätigend dargestellt werden (Daten nicht gezeigt).

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob auch BAG Δ C noch mit Parkin interagiert. BAG Δ C ist eine Deletionsmutante von BAG1, die durch den Verlust von 29 AS am C-Terminus die Fähigkeit verliert, an Hsp70 zu binden.

Für diesen Versuch wurde FLAG-Parkin mit BAG Δ C transient in HEK293-Zellen überexprimiert und eine Präzipitation über den FLAG-tag, wie oben beschrieben, durchgeführt. Der im Anschluss an die Präzipitation durchgeführte Western Blot zeigte ein spezifisches Signal für BAG Δ C und damit die Bestätigung, dass auch BAG Δ C an Parkin bindet. Bei der Überexpression von FLAG-Parkin bzw. BAG Δ C mit pcDNA-LV konnte dagegen kein spezifisches Signal detektiert werden (s. Abb. 3.2 oben).

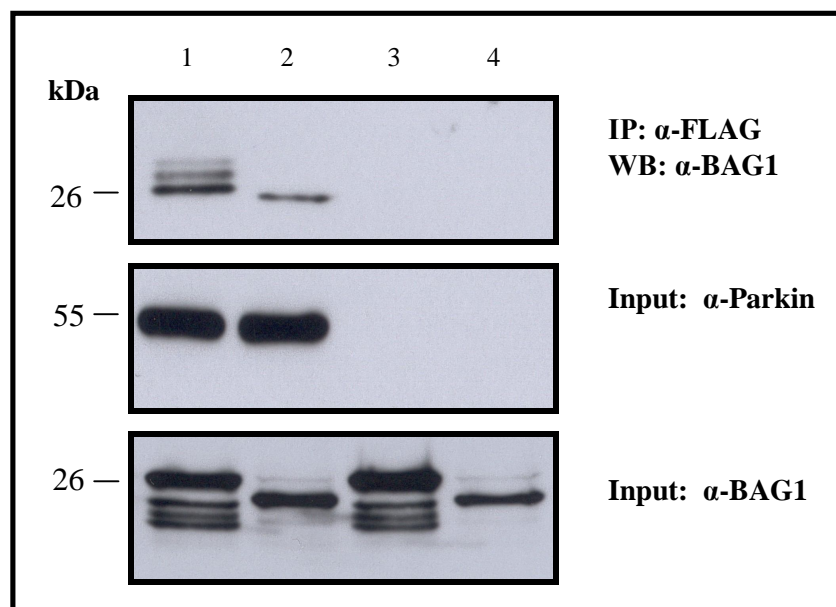


Abb. 3.2: Immunoblot nach Überexpression von FLAG-Parkin und BAG1 bzw. BAG Δ C in HEK293-Zellen. Überexprimiertes FLAG-Parkin wurde über FLAG-Beads präzipitiert. Anschließend wurde im Western Blot BAG1 detektiert (oben). Zur Kontrolle der Expression wurden das Voll-Lysat (Input) mit Parkin- und BAG1-Antikörpern analysiert (unten). 1: FLAG-Parkin+BAG1; 2: FLAG-Parkin+BAG Δ C; 3: pcDNA-LV+BAG1; 4: pcDNA-LV+BAG Δ C.

Zusammenfassend konnte durch die oben beschriebenen Co-Immunopräzipitations-Versuche dargestellt werden, dass sowohl BAG1 als auch BAG Δ C mit Parkin interagieren. Für die Bindung der beiden Proteine scheint daher die C-terminale BAG-Domäne des BAG1 nicht entscheidend zu sein.

3.1.2 Immunozytochemie von Parkin und BAG1 in CSM14.1-Zellen

In einem zweiten Ansatz sollte eine Co-Lokalisation von Parkin und BAG1 mit Hilfe von Immunozytochemie-Versuchen in der Zelle dargestellt werden. Durch fluoreszierende Signalpeptide, wie beispielsweise dem GFP-tag, oder durch fluoreszierende Antikörper können Proteine in der Zelle und durch die Überlagerung der Farbsignale auch Interaktionen sichtbar gemacht werden. Für die Versuche wurden CSM14.1-Zellen verwendet.

Überexpression von Parkin

Zunächst erfolgte eine alleinige Überexpression von Parkin. Hierbei zeigte sich eine homogene Verteilung des Parkin-Farbsignals im gesamten Zytoplasma (s. Abb. 3.3 A-C).

In einigen Zellen wurden mehrere kleine zytoplasmatische Aggregate detektiert, andere zeigten perinukleäre Akkumulationen von Parkin (s. Abb. 3.3 D-F). Diese Aggregation konnte sowohl bei einer Überexpression von GFP-Parkin, als auch von Wildtyp-Parkin (wt-Parkin) mit Anfärbung über fluoreszierende Antikörper dargestellt werden (Daten nicht gezeigt). Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Akkumulation nicht auf das GFP-Signalpetid zurückzuführen ist.

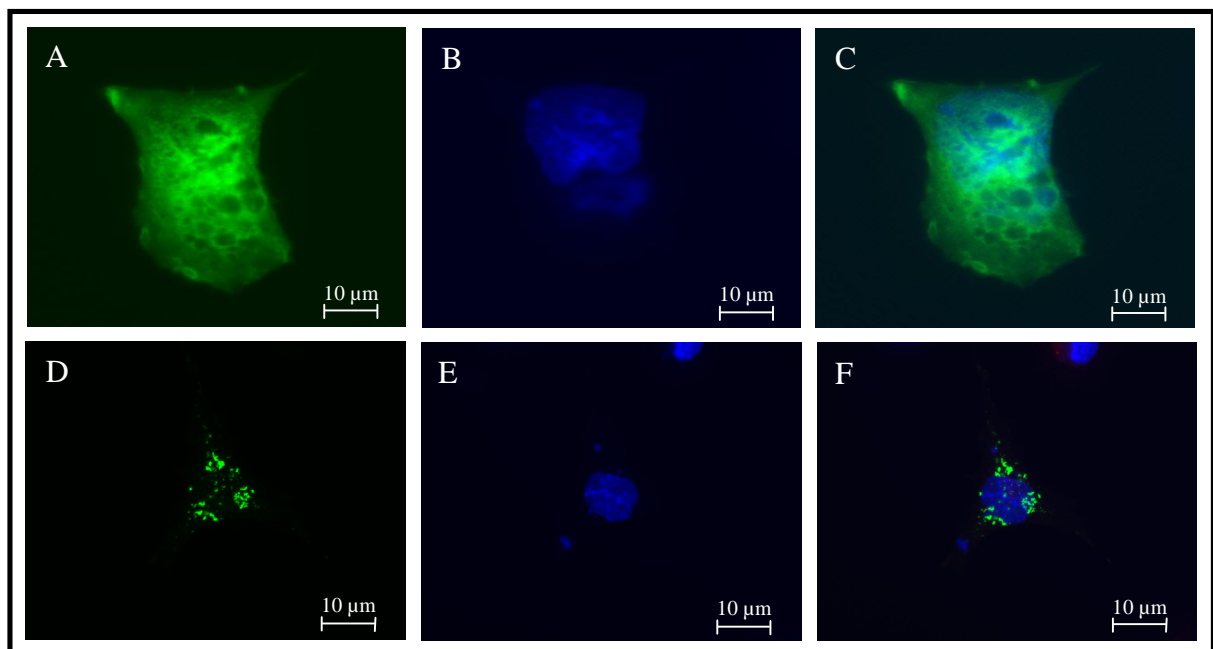


Abb. 3.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (63x Objektiv) nach Überexpression von GFP-Parkin und pcDNA-LV in CSM14.1-Zellen. Obere Reihe (A-C): Homogene Verteilung von GFP-Parkin im Zytoplasma. Untere Reihe (D-F): Akkumulation von GFP-Parkin in zytoplasmatische Aggregate bei Überexpression. A: GFP-Parkin; B: DAPI; C: Überlagerung; D: GFP-Parkin; E: DAPI; F: Überlagerung.

Überexpression von BAG1

Bei der Überexpression von GFP-BAG1 in CSM14.1-Zellen zeigte sich, wie in der Literatur beschrieben (Kermer et al. 2002), eine homogene Verteilung im Zytoplasma sowie eine kräftige Anreicherung von BAG1 im Nukleus (Daten nicht gezeigt).

Überexpression von Parkin und GFP-BAG1

Zur Darstellung einer Co-Lokalisation beider Proteine wurden Parkin und GFP-BAG1 in CSM14.1-Zellen überexprimiert. GFP-BAG1 zeigt, wie auch schon bei der alleinigen Überexpression, eine zytoplasmatische und nukleäre Lokalisation (s. Abb. 3.4 A). Parkin konnte vor allem im Zytoplasma angefärbt werden (s. Abb. 3.4 B).

Eine Überlagerung der Farbsignale von GFP-BAG1 (grün) mit Parkin (rot) und damit eine mutmaßliche Co-Lokalisation der beiden Proteine konnte in allen doppelt transfizierten Zellen nachgewiesen werden. Diese Co-Lokalisation lies sich vorallem im Zytoplasma darstellen (s. Abb. 3.4 D). Auch bei der Co-Expression von Parkin mit GFP-BAG1 wurden die schon bei alleiniger Parkin-Überexpression beschriebenen Aggregate in einigen Zellen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

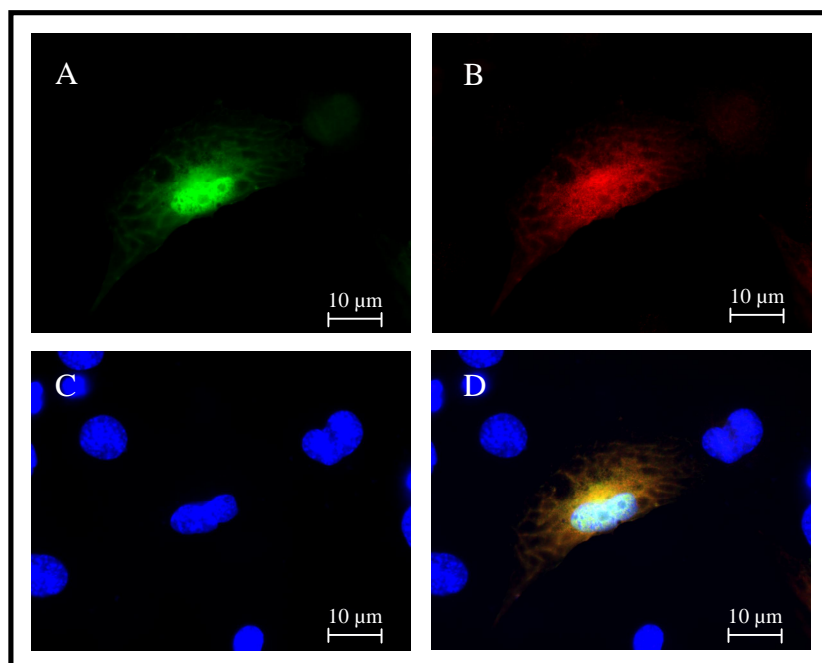


Abb. 3.4: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (63x Objektiv) nach Überexpression von Parkin und GFP-BAG1 in CSM14.1-Zellen. Parkin wurde mit einem Cy3-gekoppelten Antikörper gefärbt. A: GFP-BAG1; B: Parkin; C: DAPI; D: Überlagerung.

Überexpression von Parkin und GFP-BAG Δ C

Da bereits in Co-Immunopräzipitations-Versuchen eine Interaktion von Parkin und BAG Δ C nachgewiesen werden konnten, sollte diese Bindung bestätigend in Immunocytochemie-Versuchen dargestellt werden. Bei der Überexpression von Parkin und GFP-BAG Δ C in CSM14.1-Zellen zeigte sich, wie schon zuvor bei BAG1, eine Übereinstimmung der Lokalisation von Parkin und BAG Δ C im Zytoplasma der Zelle (s. Abb. 3.5 D).

Durch die Deletionsmutation am C-Terminus des Proteins verliert BAG Δ C, wie bereits berichtet (Liman et al. 2005), die nukleäre Lokalisation und ist nur zytoplasmatisch nachweisbar (s. Abb. 3.5 A).

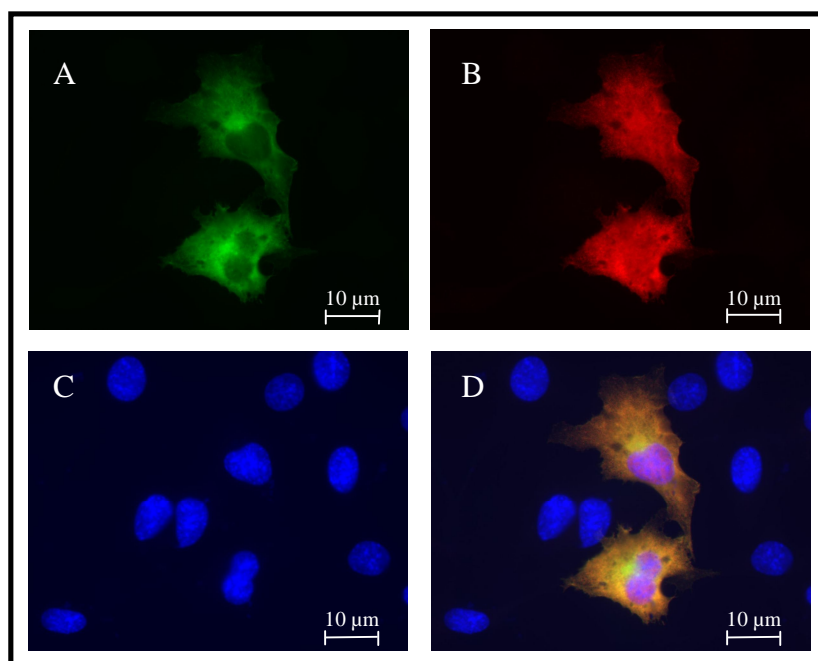


Abb. 3.5: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen (63x Objektiv) nach Überexpression von Parkin und GFP-BAG Δ C in CSM14.1-Zellen. Parkin wurde mit einem Cy3-gekoppelten Antikörper gefärbt. A: GFP-BAG Δ C, B: Parkin, C: DAPI, D: Überlagerung.

Mit den Immunocytochemie-Versuchen wurde gezeigt, dass Parkin, BAG1 sowie BAG Δ C zytoplasmatische Proteine sind. BAG1 konnte zudem nukleär lokalisiert werden. Parkin, BAG1 sowie BAG Δ C verteilen sich homogen im Zytoplasma, wobei Parkin bei Überexpression in einigen Zellen zu zytoplasmatischen Aggregaten akkumuliert. Eine Co-Lokalisation zwischen Parkin und BAG1 ebenso mit BAG Δ C konnte im Zytoplasma immunocytochemisch bestätigt werden.

3.2. Kartierung der interagierenden Domäne unter Verwendung verschiedener Parkin-Deletionsmutanten

Um die für die Interaktion mit BAG1 relevante Parkin-Domäne zu identifizieren, wurden verschiedene FLAG-Parkin-Deletionsmutanten kloniert und im Anschluss für Co-Immunopräzipitations-Versuche mit BAG1 überexprimiert.

3.2.1 Parkin-Deletionsmutations-Konstrukte

Für ein direktes „mapping“ der interagierenden Domäne wurden zunächst die mit einem FLAG-tag versehenen Parkin-Deletionsmutanten FLAG- Δ UBL (AS 77- 465), FLAG- Δ Linker (AS 217- 465), FLAG- Δ Ring1 (AS 304- 465) und FLAG- Δ IBR (AS 395- 465) kloniert. Wie in Abbildung 3.6 zu sehen ist, fehlt der Δ UBL-Mutante die *Ubiquitin-like*-Domäne, der Δ Linker-Mutante zusätzlich Teile der Linker-Region und der Δ Ring1-Mutante des Weiteren die erste Ring-Domäne. Die Δ IBR-Mutante besteht funktionell nur noch aus dem zweiten Ring der Ring-IBR-Ring-Domäne. Alle Parkin-Fragmente wurden in den Vektor pcDNA3.1 kloniert. Als Matrize diente pcDNA-FLAG-Parkin, das für humanes wt-Parkin kodiert. Die N-terminalen Deletionsmutanten wurden ausgehend von pcDNA-FLAG-Parkin-Plasmid mit dem jeweiligen *EcoRI*-Forward- und dem *NotI*-Backward-Primer amplifiziert. Über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NotI* wurde das Produkt in das Plasmid pcDNA3.1 ligiert.

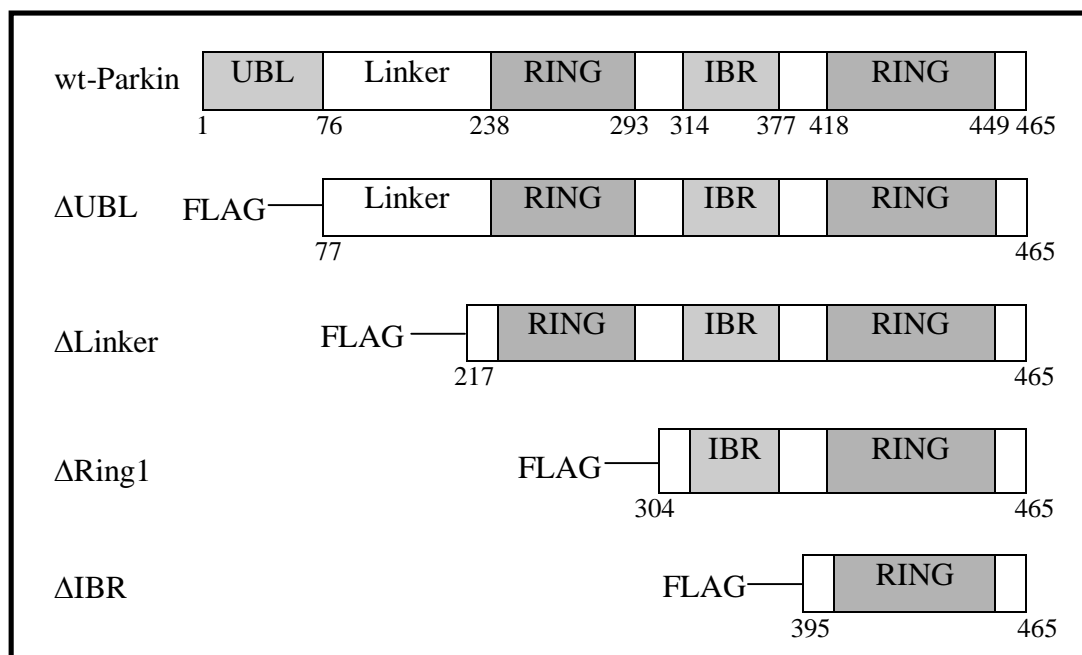


Abb. 3.6: Schematische Darstellung der klonierten Parkin-Deletionsmutantions-Konstrukte. Zusätzlich ist noch wt-Parkin ohne Signalpeptid abgebildet.

3.2.2 Restriktionsenzymverdau der Parkin-Deletionsmutanten

Zur Kontrolle der korrekten Ligatur der Parkin-Deletionsmutanten wurden die Inserts nach einer Mini-Präparation durch die Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *NotI* aus dem Vektor herausgeschnitten. Die folgende Abbildung zeigt den Verdau der vier Parkin-Deletionsmutanten und des wt-Parkin. Aufgrund der geringen Größe und der damit verbundenen schnelleren Laufgeschwindigkeit im Gel, konnte die Δ IBR-Mutante bei normaler Belichtungszeit nicht detektiert werden. Eine längere Belichtungszeit bestätigte aber die Anwesenheit des DNA-Fragments (s. Abb. 3.7 rechts). Die dargestellten DNA-Banden weisen alle die jeweils berechnete korrekte Größe in Basenpaaren (bp) auf.

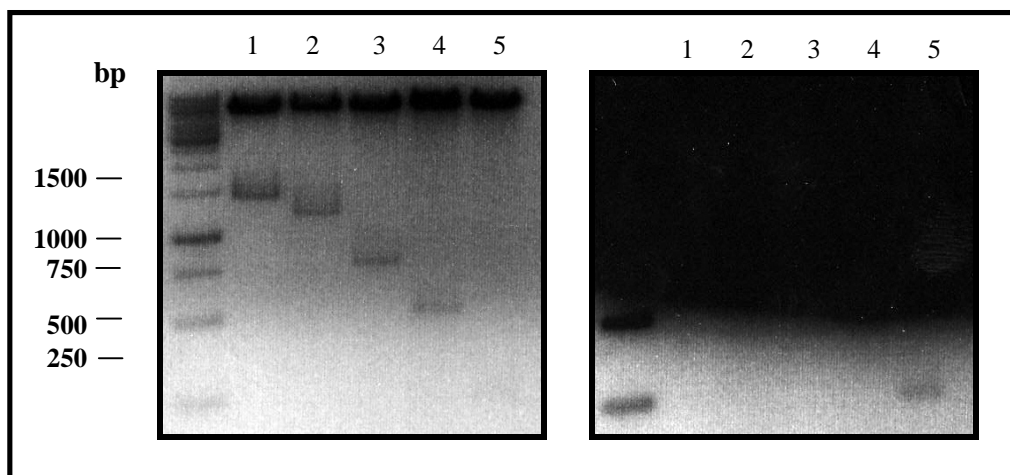


Abb. 3.7: Restriktionsenzymverdau der Parkin-Deletionsmutanten. Links: Normale Belichtungszeit; Rechts: verlängerte Belichtungszeit zur Darstellung der Δ IBR-Mutante. 1: wt-Parkin; 2: FLAG- Δ UBL-Mutante; 3: FLAG- Δ Linker-Mutante; 4: FLAG- Δ Ring1-Mutante; 5: FLAG- Δ IBR-Mutante.

3.2.3 Sequenzierung der Parkin-Deletionsmutanten

Die durch die Sequenzierung erhaltende Basenfolge wurde manuell mit der bekannten zugehörigen Parkin-Sequenz verglichen. Bei allen Parkin-Deletionsmutanten konnten ungewollte Punkt- und Rastermutationen ausgeschlossen werden, da die Basenfolgen vollständig mit der zugehörigen Parkin-Sequenz übereinstimmten.

3.2.4 Überexpression der Deletionsmutanten in HEK293- und CSM14.1-Zellen

Nach erfolgreicher Klonierung wurden die Parkin-Deletionsmutanten zunächst in HEK293- und CSM14.1-Zellen überexprimiert. Die folgende Abbildung zeigt die Transfektion der Parkin-Deletionsmutanten in HEK293-Zellen. Bis auf das FLAG- Δ IBR-Deletionskonstrukt konnten alle Mutanten erfolgreich in beiden Zelllinien exprimiert und dargestellt werden. Eine Transfektion mit pcDNA-LV diente als Negativkontrolle.

Als Grund für die erfolglose Expression des FLAG- Δ IBR-Konstruktes wurde eine erhöhte Abbaurrate, zusammenhängend mit der geringen Größe der Mutante, vermutet.

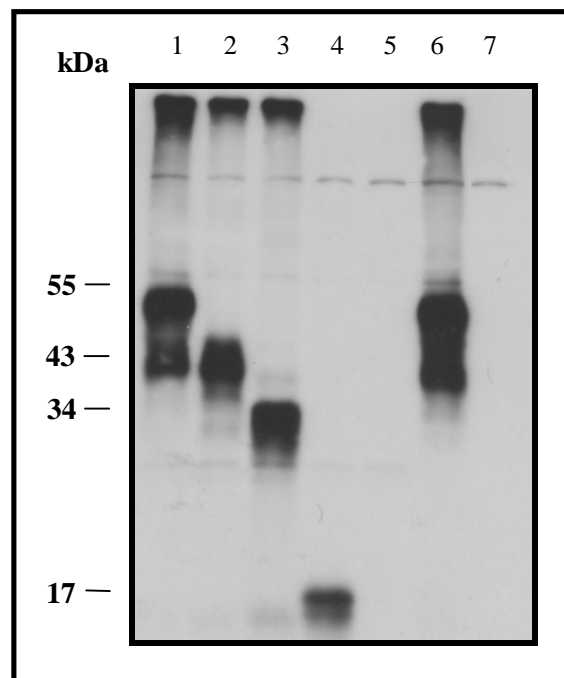


Abb. 3.8: Immunoblot nach Überexpression der Parkin-Deletionsmutanten in HEK293-Zellen. Beim Western Blot wurde Parkin detektiert. 1: FLAG-Parkin; 2: FLAG- Δ UBL-Mutante; 3: FLAG- Δ Linker-Mutante; 4: FLAG- Δ Ring1-Mutante; 5: FLAG- Δ IBR-Mutante; 6: wt-Parkin; 7: pcDNA-LV.

3.2.5 Kartierungsexperimente unter Verwendung der Parkin-Deletionsmutanten und BAG1

Zur Kartierung der interagierenden Domäne wurden die vier FLAG-Parkin-Deletionsmutanten in HEK293-Zellen zusammen mit BAG1 überexprimiert. Als Negativkontrolle diente die Co-Transfektion von BAG1 mit pcDNA-LV. Zur Positivkontrolle wurde FLAG-wt-Parkin zusammen mit BAG1 überexprimiert. Die Präzipitation erfolgte mittels FLAG-Beads wie bereits in Kap. 3.1.1 beschrieben. Im Anschluss wurde im Western Blot gegen BAG1 detektiert.

Wie in Abbildung 3.9 zu sehen ist, lässt sich eine Interaktion zwischen der FLAG- Δ UBL-, der FLAG- Δ Linker- sowie der FLAG- Δ Ring1-Mutante mit BAG1 darstellen. Bei diesen Konditionen konnte ein spezifisches positives BAG1-Signal im Western Blot, vergleichbar mit der Positivkontrolle, detektiert werden. Bei der Co-Expression der FLAG- Δ IBR-Mutante mit BAG1 konnte dagegen kein BAG1-Signal dargestellt werden.

Da schon in der oben beschriebenen Expressionskontrolle diese Mutante nicht darstellbar war, kann davon ausgegangen werden, dass das fehlende BAG1-Signal hierauf zurückzuführen ist.

Auf eine fehlende Interaktion der beiden Proteine kann jedoch nicht geschlossen werden. Die in Abbildung 3.9 dargestellten Ergebnisse konnten auch in der neuronalen Zelllinie CSM14.1 erzielt werden (Daten nicht gezeigt).

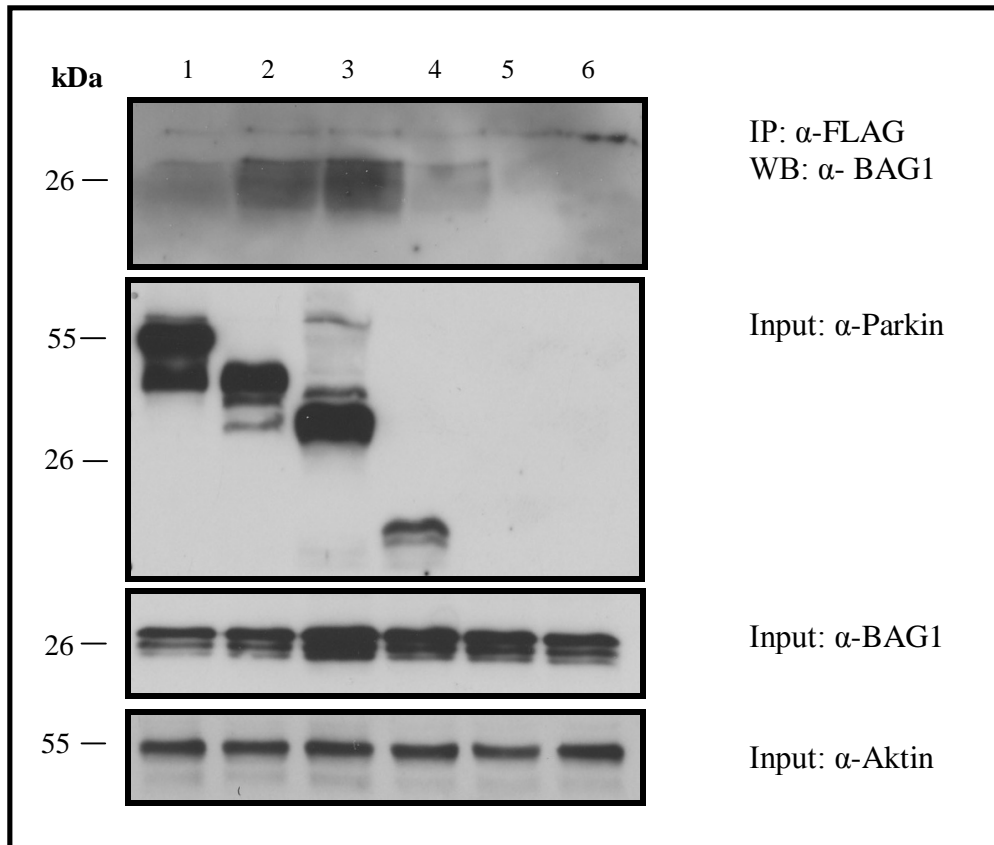


Abb. 3.9: Immunoblot nach Überexpression der Parkin-Deletionsmutanten mit BAG1 in HEK293-Zellen. Die überexprimierten Parkin-Deletionsmutanten wurden über FLAG-Beads präzipitiert. Anschließend wurde im Western Blot BAG1 detektiert (oben). Zur Kontrolle der Expression wurden das Voll-Lysat (Input) mit Parkin-, BAG1- und Aktin-Antikörpern analysiert (unten). 1: FLAG-wt-Parkin+BAG1; 2: FLAG- Δ UBL-Mutante+BAG1; 3: FLAG- Δ Linker-Mutante+BAG1; 4: FLAG- Δ Ring1-Mutante+BAG1; 5: FLAG- Δ IBR-Mutante+BAG1; 6: BAG1+pcDNA-LV.

3.3 Funktionelle Untersuchungen der E3-Ligase-Funktion von Parkin

Parkin ist mit seiner E3-Ligase-Funktion Teil des UPS. Über die Ubiquitinylierung von Substratproteinen führt Parkin diese dem Abbau durch das Proteasom zu. Über die Ubiquitinylierung von CDCrel-1, eines der Substratproteine, oder dessen beschleunigte Abbaurate lässt sich die E3-Ligase-Aktivität untersuchen.

3.3.1 Degradationszeitreihen unter Verwendung von Cycloheximid als Translations-Inhibitor

Um den Einfluss von BAG1 auf die E3-Ligase-Funktion von Parkin zu erfassen, sollte zunächst die Abbaurate des Substratproteins CDCrel-1 untersucht werden.

Hierfür wurden CSM14.1-Zellen mit HA-CDCrel-1, Parkin, BAG1 und BAG Δ C transfiziert und 17 Std später mit dem Antibiotikum Cycloheximid behandelt, wodurch über die Inhibition der Proteinbiosynthese die Halbwertszeit von Proteinen bestimmt werden kann. Die CSM14.1-Zellen wurden für 0, 1,5, 3, 6 und 9 Std mit dem Antibiotikum inkubiert und im Anschluss mittels Western Blot analysiert.

Abbildung 3.10 zeigt die zeitliche Verminderung der HA-CDCrel-1-Proteinkonzentration in den verschiedenen Konditionen.

Bei einer Co-Expression von HA-CDCrel-1 mit Parkin lässt sich ein verminderter HA-CDCrel-1-Proteingehalt, vorallem bei einer Inkubationszeit von 6 und 9 Std, im Vergleich zur Negativkontrolle (HA-CDCrel-1+pcDNA-LV) darstellen. Die Co-Transfektion des Substratproteins mit BAG1, BAG Δ C oder Parkin und BAG1 bzw. BAG Δ C ergab dagegen Proteinlevel vergleichbar mit der Negativkontrolle.

Zur Sicherstellung vergleichbarer Proteinmengen wurde sowohl eine Konzentrationsbestimmung mittels eines BCA-Assays durchgeführt als auch im Anschluss an den Western Blot die Menge an Aktin als Kontrollprotein detektiert. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde jedoch auf die Darstellung der Aktinkontrolle in Abbildung 3.10 verzichtet.

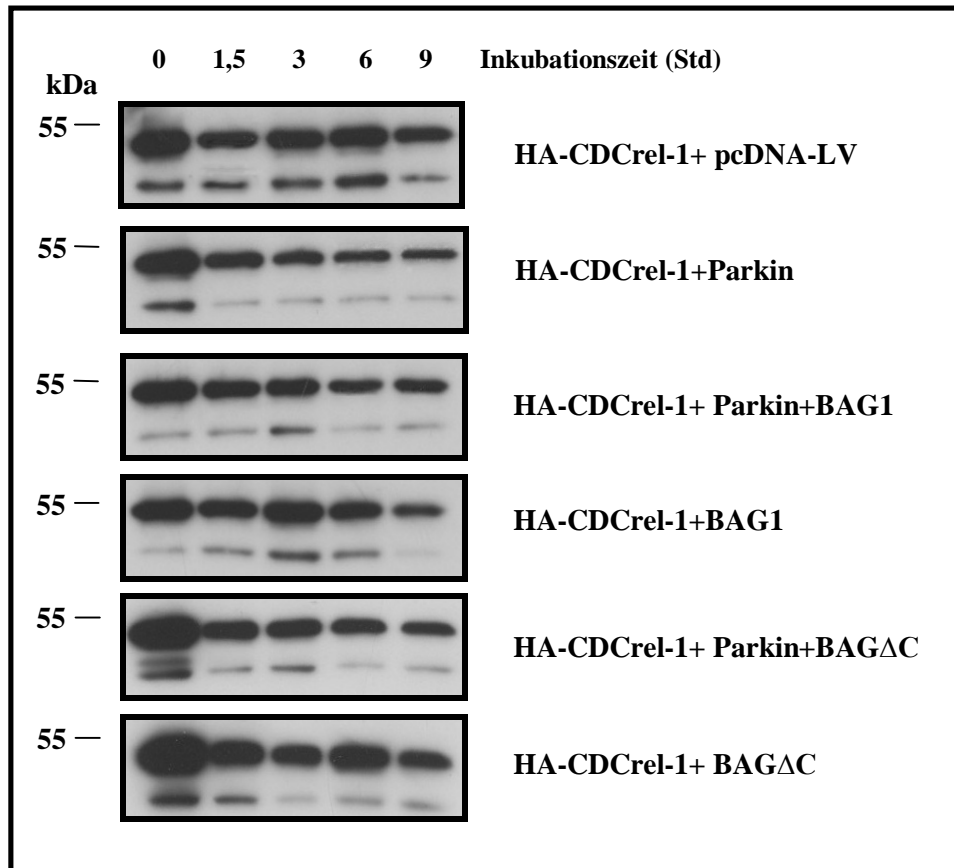


Abb. 3.10: Immunoblot der Halbwertszeit des Substratproteins HA-CDCrel-1. CSM14.1-Zellen wurden mit HA-CDCrel-1 und Parkin, BAG1 bzw. BAGΔC überexprimiert, 17 Std nach der Transfektion mit 20 µg/ml Cycloheximid behandelt und für 0, 1,5, 3, 6 und 9 Std inkubiert. Im Western Blot wurde gegen CDCrel-1 detektiert.

3.3.2 Die Parkin-vermittelte Ubiquitylierung des Substratproteins CDCrel-1

Die oben beschriebenen Beobachtungen der Cycloheximid-Experimente wurden in einem zweiten experimentellen Ansatz verifiziert. Hierbei wurde die Parkin-vermittelte Ubiquitylierung des Substratproteins CDCrel-1 in An- bzw. Abwesenheit von BAG1 und BAGΔC im Western Blot untersucht.

CSM14.1-Zellen wurden mit HA-CDCrel-1, Parkin, BAG1 und BAGΔC überexprimiert und 12 Std nach der Transfektion mit dem Proteasom-Inhibitor MG 132 für weitere 12 Std inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Präzipitation des Substratproteins mit Hilfe eines gegen den HA-tag gerichteten Antikörpers. Durch die Hemmung des proteasomalen Abbaus akkumulieren ubiquitylierte Proteine in der Zelle. Diese können als hochmolekulare Banden im Western Blot als sogenannte „Ubiquitin-Leiter“ oder „Ubiquitin-smear“ nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung des hochmolekularen, ubiquitylierten CDCrel-1-Anteils wurden verschiedene Ubiquitin-Antikörper verwendet. Da jedoch alle verwendeten Antikörper ein

hohes Maß an unspezifischen Bindungen aufwiesen, wurde in der folgenden Abbildung ein spezifischer CDCrel-1 Antikörper verwendet. Die hochmolekularen Banden zeigten eine Übereinstimmung bei beiden Analysen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass diese Banden den ubiquitinylierten CDCrel-1 entsprechen.

Bei der Präzipitation kam es zu einer Überlagerung der HA-CDCrel-1 Bande mit der schweren Kette des Antikörpers (s. Abb. 3.11 oben). Bei diesem Versuch sollten jedoch nur die höhermolekularen, ubiquitinylierten Proteinanteile berücksichtigt werden.

Der hochmolekulare Anteil des Proteins HA-CDCrel-1 und damit der Anteil des ubiquitinylierten Proteins ist quantitativ am stärksten bei der Co-Transfektion von HA-CDCrel-1 und Parkin ausgeprägt (s. Abb. 3.11 oben). Auch diese Beobachtung bestätigt, dass CDCrel-1 ein Parkin-Substratprotein ist und durch dieses ubiquitinyliert sowie seinem Abbau zugeführt wird.

Sowohl die Co-Expression von HA-CDCrel-1 mit BAG1, Parkin und BAG1, Parkin und BAG Δ C, als auch die alleinige Co-Transfektion mit BAG Δ C entsprechen quantitativ der Kontrollbedingung, d.h. einer Überexpression des Substratproteins mit pcDNA-LV.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass BAG1 einen inhibierenden Einfluss auf die E3-Ligase-Funktion von Parkin hat, da hier der Anteil des ubiquitinylierten Substratproteins vermindert ist. Die Deletionsmutante des BAG1, BAG Δ C, übt den gleichen hemmenden Effekt auf Parkin aus.

Die in Abbildung 3.11 dargestellte verminderte Parkin-vermittelte Ubiquitinylierung des Substratproteins CDCrel-1 bei Anwesenheit von BAG1 und BAG Δ C sind somit kongruent mit den in Kapitel 3.3.1 gezeigten Ergebnissen.

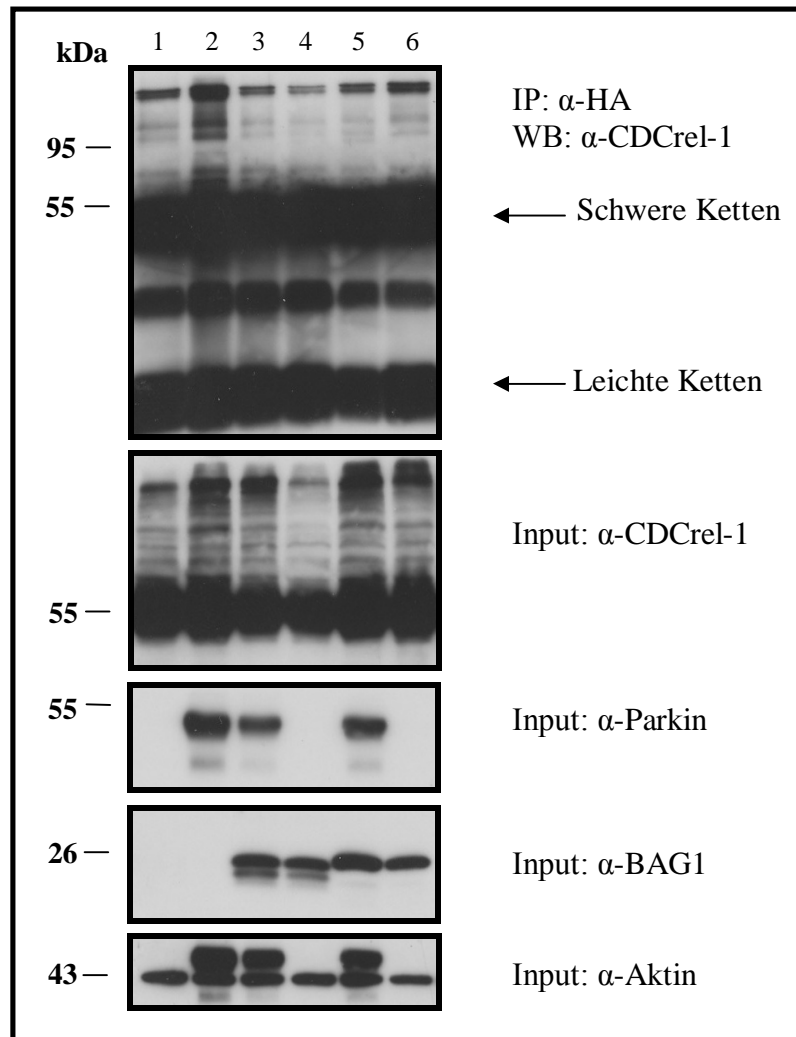


Abb. 3.11: Immunoblot der Ubiquitinylierung des Substratproteins HA-CDCrel-1. CSM14.1-Zellen wurden transient mit HA-CDCrel-1, Parkin, BAG1 sowie BAGΔC transfiziert. HA-CDCrel-1 wurde über HA-Beads präzipitiert und anschließend im Western Blot über α-CDCrel-1 detektiert (oben). Zur Kontrolle wurde das Voll-Lysat (Input) mit CDCrel-1, Parkin-, BAG1- und Aktin-Antikörper analysiert (unten). 1: HA-CDCrel-1+pcDNA-LV; 2: HA-CDCrel-1+Parkin; 3: HA-CDCrel-1+Parkin+BAG1; 4: HA-CDCrel-1+BAG1; 5: HA-CDCrel-1+Parkin+BAGΔC; 6: HA-CDCrel-1+ BAGΔC.

Mit diesen beiden Experimenten konnte gezeigt werden, dass BAG1 und auch die Deletionsmutante BAGΔC einen inhibierenden Einfluss auf die E3-Ligase-Funktion von Parkin zu haben scheint. Sowohl die Abbaurate, als auch die Parkin-vermittelte Ubiquitinylierung des Substratproteins CDCrel-1 waren bei einer Co-Expression mit BAG1 oder BAGΔC vermindert.

3.4 Der Einfluss von BAG1 auf die Lokalisation und Löslichkeit von Parkin

3.4.1. Untersuchung zur subzellulären Lokalisation von Parkin

Als nächstes sollte die subzelluläre Verteilung von Parkin und die Einflussnahme von BAG1 bzw. BAGAC mittels Western Blot untersucht werden. Durch eine fraktionierte Lyse von SH-SY5Y-Zellen mit vier unterschiedlichen Puffern erfolgte eine Aufteilung der Proteine in Zytoplasma, Membran und Zellorganellen, Nukleus sowie Zytoskelett. Die erfolgreiche Fraktionierung wurde durch die Detektion spezifischer Proteine der einzelnen Kompartimente belegt (s. Abb. 3.12 A und B unten).

Parkin konnte in den Fraktionen Zytoplasma, Membran und Organellen, sowie Zytoskelett sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von BAG1 bzw. BAGAC detektiert werden. Im nukleären Kompartiment konnte Parkin in keiner der Konditionen dargestellt werden (s. Abb. 3.12 A). Auffällig ist jedoch, dass bei der Co-Expression mit BAG1, Parkin deutlich reduziert in allen oben genannten Fraktionen nachweisbar war. Die gleichzeitige Überexpression mit BAGAC ergab in der zytoplasmatischen und membranösen Fraktion ein ähnliches Verteilungsmuster zur alleinigen Parkin-Expression. Im zytoskelettalen Kompartiment konnte Parkin jedoch auch hier deutlich vermindert nachgewiesen werden (s. Abb. 3.12 A).

Die subzelluläre Lokalisation von Parkin sollte in einem zweiten Ansatz unter Inhibition des Proteasoms untersucht werden. Hierfür wurden die SH-SY5Y-Zellen zusätzlich mit MG 132 für 12 Std inkubiert.

Bei diesem Versuch konnte Parkin in allen vier Kompartimenten, also auch der nukleären Fraktion nachgewiesen werden. Die oben beschriebene Beobachtung eines verminderten Parkin-Proteinlevels bei der Co-Expression mit BAG1 konnte auch bei der Inhibition des Proteasoms mit MG 132 beobachtet werden (s. Abb. 3.12 B). Am stärksten wurde dieser Unterschied in der Fraktion des Zytoskeletts sichtbar. Hier wurde vor allem der hochmolekulare Anteil von Parkin vermindert detektiert.

Bei der Co-Expression mit BAGAC zeigte sich in den Fraktionen Zytoplasma, Membran und Organellen, sowie Nukleus eine annähernd gleich starke Parkin-Verteilung vergleichbar mit der alleinigen Expression von Parkin. Lediglich im zytoskelettalen Kompartiment konnten die hochmolekularen Anteile von Parkin vermindert nachgewiesen werden (s. Abb. 3.12 B). Dies entspricht der Verteilung ohne den Proteasom-Inhibitor.

Zusammenfassend konnte Parkin bei einer Co-Expression mit BAG1 in allen zellulären Kompartimenten vermindert nachgewiesen werden. Vorallem in der zytoskelettalen Fraktion wurde ein geringerer Anteil des hochmolekularen, ubiquitinylierten Parkins detektiert. Im

nukleären Kompartiment kam Parkin nur nach vorheriger Inhibition des Proteasoms zur Darstellung.

Als Ursache für die geringere Nachweisbarkeit wurden Änderungen in der Halbwertszeit und Löslichkeit von Parkin vermutet. Dieses sollte in den nächsten Experimenten näher untersucht werden.

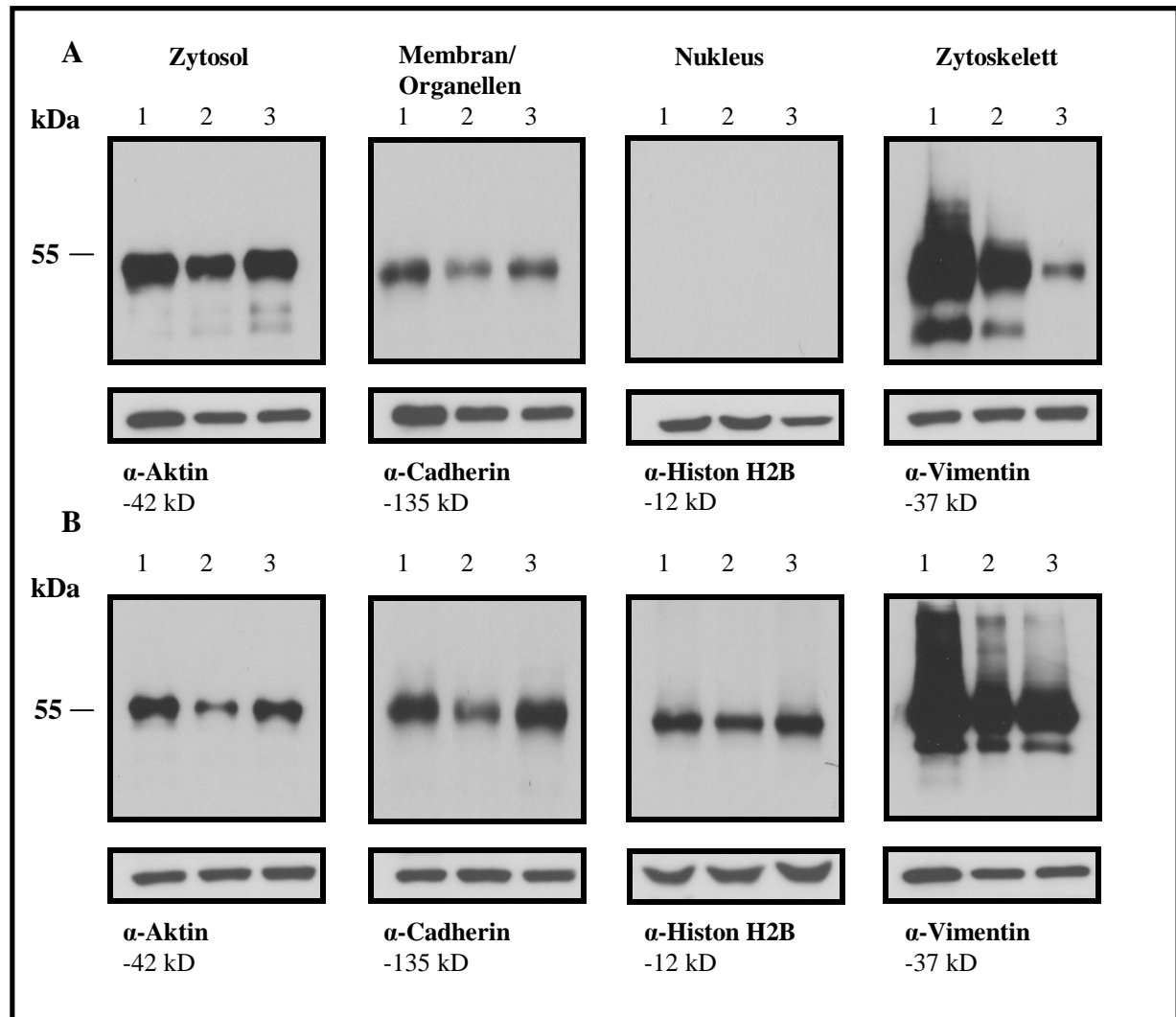


Abb. 3.12: Immunoblot der subzelluläre Fraktionierung von Parkin in SH-SY5Y-Zellen. SH-SY5Y-Zellen wurden mit Parkin, BAG1 und BAGΔC überexprimiert und eine subzelluläre Fraktionierung durchgeführt. Im Anschluss wurde Parkin mittels Western Blot analysiert (A und B oben). Zur Kontrolle der korrekten Lysierung wurden Aktin (Zytosol), Cadherin (Membran/Organellen), Histon H2B (Nukleus) und Vimentin (Zytoskelett) verwendet. SH-SY5Y-Zellen zusätzlich mit 20 μ M MG 132 für 12 Std inkubiert (B). 1: Parkin+pcDNA-LV; 2: Parkin+BAG1; 3: Parkin+BAGΔC.

3.4.2 Untersuchungen zur Löslichkeit und Ubiquitinylierung von Parkin

Bei den in Kap. 3.1.2 beschriebenen Immunozytochemie-Versuchen konnten einzelne Parkin-Aggregate nachgewiesen werden und auch bei der subzellulären Lysierung in Kap. 3.4.1 wurden Vermutungen über eine verminderte Löslichkeit von Parkin bei Co-Expression von BAG1 gestellt. Diese Hypothese sollte in weiteren Versuchen objektiviert werden.

Hierfür wurde zunächst das Aggregationsverhalten von Parkin in Immunozytochemie-Versuchen morphologisch untersucht und im Anschluss manuell ausgezählt.

Morphologisch konnten in überexprimierten CSM14.1-Zellen sowohl viele kleinere peripher gelegene Parkin-Akkumulationen (s. Abb. 3.3), als auch singuläre perinukleäre Aggregate dargestellt werden (s. Abb. 3.13 A). Diese Parkin-Akkumulation zeigte sich sowohl bei der alleinigen Expression von Parkin, als auch bei der Co-Transfektion mit BAG1 und BAG Δ C.

Bei der Anfärbung von Tubulin zeigte sich zudem, dass das Zytoskelett eine Art „Korb“ um diese Aggregate bildet und diese so vom Rest des Zytoplasmas abschottet (s. Abb. 3.13 B).

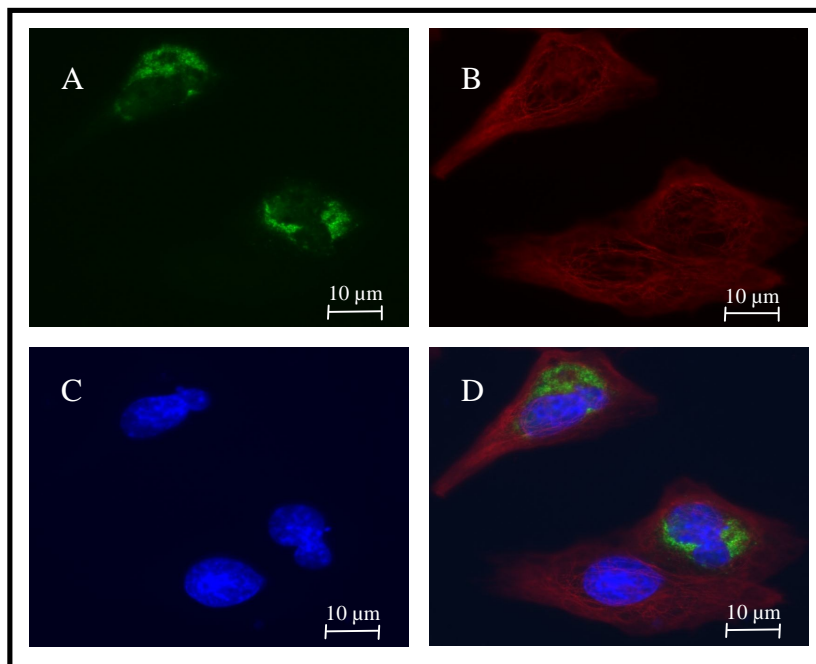


Abb. 3.13: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme (63x Objektiv) nach Überexpression von GFP-Parkin mit BAG1 in CSM14.1-Zellen. Dargestellt sind perinukleäre Parkin-Aggregationen mit einem umgebenden Tubulin-„Korb“. Tubulin wurde mit einem Cy3-gekoppeltem Antikörper gefärbt. A: GFP-Parkin; B: Tubulin; C: DAPI; D: Überlagerung.

Zur Analyse, ob die Anwesenheit von BAG1 bzw. BAG Δ C Einfluss auf das Akkumulationsverhalten von Parkin in der Immunozytochemie hat, erfolgte eine Auszählung der aggregathaltigen Zellen in den jeweiligen Konditionen unter dem Fluoreszenzmikroskop bei 40-facher Vergrößerung. Hierfür wurden auf je drei Cover-Slips alle CSM14.1-Zellen mit mindesten einem sichtbaren Aggregat gezählt und der Quotient zu allen transfizierten Zellen

errechnet. Dabei wurden nur doppelt transfizierte Zellen berücksichtigt. Eine zweite Auszählung erfolgte mit MG 132 behandelten CSM14.1-Zellen.

Bei der Co-Transfektion von GFP-Parkin mit BAG1 konnte mit Hilfe eines Student-T-Testes ($p < 0,01$) ein signifikant erhöhter Anteil von CSM14.1-Zellen mit Parkin-Aggregaten im Vergleich zur alleinigen Parkin-Transfektion und Co-Transfektion mit BAG Δ C nachgewiesen werden. Bei der Anwesenheit von BAG1 hatten im Mittel 47,1% \pm 1,5% der doppelt transfizierten Zellen ein oder mehr Parkin-Aggregate. Bei Überexpression von Parkin mit pcDNA-LV lag der Anteil durchschnittlich nur bei etwa 19,9% \pm 3,1%. Ein annähernd ähnlicher Prozentsatz von aggregathaltigen Zellen ergab die Co-Transfektion von Parkin mit Bag Δ C. Hier ließen sich bei 21,9% \pm 3% der Zellen Parkin-Aggregate nachweisen (s. Abb. 3.14 A).

Ein vergleichbares Bild ergab die Auszählung der mit dem Proteasom-Inhibitor MG 132 behandelten CSM14.1-Zellen. Auch hier konnte ein signifikant erhöhter Anteil Parkin-aggregathaltiger Zellen bei einer Überexpression von Parkin mit BAG1 im Student-T-Test ($p < 0,05$) nachgewiesen werden. Hier wiesen durchschnittlich 61,3 % \pm 2,4% bzw. 64,6 % \pm 2,6 der Zellen bei Co-Transfektion von Parkin mit pcDNA-LV bzw. BAG Δ C zytoplasmatische Parkin-Aggregate auf. Dagegen konnten bei 83,4 % \pm 2,8% der mit Parkin und BAG1 co-transfizierten Zellen Aggregate beobachtet werden (s. Abb. 3.14 B).

Diese Beobachtung bekräftigt die Vermutung, dass BAG1 zu einer vermehrten Aggregation von Parkin führt. Einen Einfluss von BAG Δ C im Vergleich zur Negativkontrolle lässt sich jedoch nicht nachweisen.

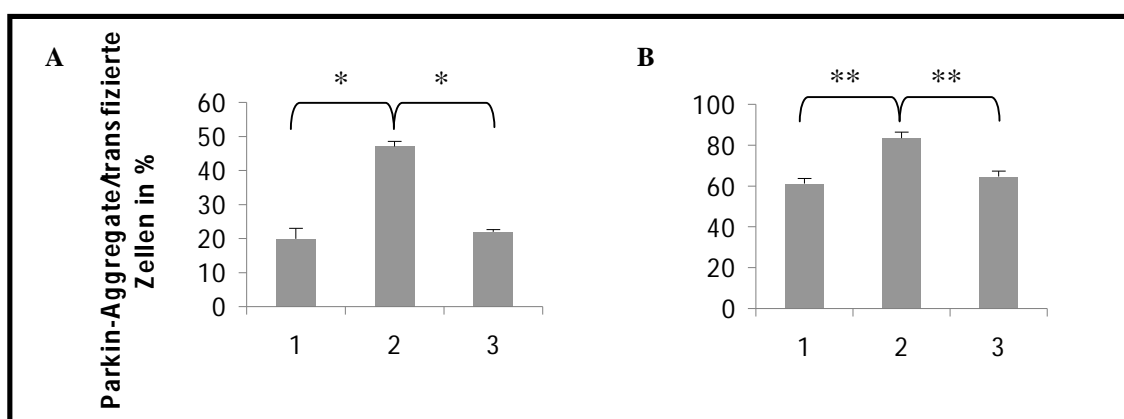


Abb. 3.14: Auszählung von Parkin-aggregathaltiger CSM14.1-Zellen in Immunozytochemie-Versuchen. Dargestellt sind die Mittelwerte zuzüglich Standardabweichung von überexprimierten CSM14.1-Zellen mit einem oder mehr Parkin-Aggregaten im Vergleich zu allen transfizierten Zellen (A). CSM14.1-Zellen wurden zusätzlich mit MG 132 für 12 Std inkubiert (B). * $p < 0,01$; ** $p < 0,05$; 1: GFP-Parkin+pcDNA-LV, 2: GFP-Parkin+BAG 1, 3: GFP-Parkin+BAG Δ C.

In weiteren Experimenten sollte darüber hinaus untersucht werden, ob Parkin BAG1-abhängig vermehrt ubiquitinyliert und hierdurch verstärkt in unlösliche Aggregate akkumuliert.

Zunächst wurden HEK293-Zellen mit Parkin, BAG1 bzw. BAGΔC überexprimiert und für Western-Blot-Analysen sowohl mit RIPA-Puffer, als auch mit 8 M Urea-Puffer lysiert.

Anders als bei der Lyse mit RIPA-Puffer können bei einer Lyse mit Urea-Puffer auch hochmolekulare Proteinanteile und zelluläre Aggregate gelöst und so analysiert werden.

Wie schon in Kapitel 3.3.2 beschrieben, wurden auch für diesen Versuch verschiedene Ubiquitin-Antikörper getestet. Es zeigte sich ein hohes Maß an unspezifischen Bindungen, vor allem in dem zu detektierenden höhermolekularen Bereich, wodurch ein deutliches „smear“-Phänomen entstand und die Beurteilbarkeit erschwert wurde (s. Abb. 3.15). Um eine gezielte Aussage über die ubiquitinylierten Anteile des Parkin-Proteins zu treffen, wurde daher nachfolgend mit dem spezifischen Parkin-Antikörper detektiert.

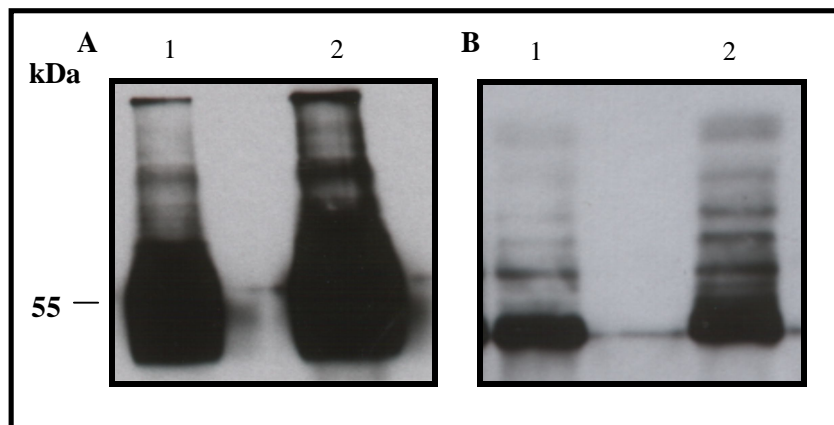


Abb. 3.15: Immunoblot zum Vergleich der höhermolekularen Parkin-Banden von Ubiquitin- und Parkin-Antikörper. HEK293-Zellen wurden transient mit FLAG-Parkin und BAG1 transfiziert. FLAG-Parkin wurde über Flag-tags präzipitiert und im Anschluss im Western Blot über α -Ubiquitin (A) und α -Parkin (B) detektiert. 1: FLAG-Parkin+pcDNA-LV; 2: FLAG-Parkin+BAG1

Die Western-Blot-Analyse mit RIPA-Zelllyse zeigte eine quantitativ schwächere Parkin-Bande bei der Co-Transfektion von Parkin mit BAG1 im Vergleich zur alleinigen Parkin-Expression bzw. Co-Expression mit BAGΔC (s. Abb. 3.16 oben). Die Beobachtung bestätigt auch die Ergebnisse der subzellulären Fraktionierung in Kap. 3.4.1. Bei der Urea-Zelllyse war dieses Verhältnis hingegen genau gegensätzlich. Hier konnte bei der gleichzeitigen Anwesenheit von BAG1 mit Parkin ein quantitativ stärkeres Signal, vorallem in dem hochmolekularen, ubiquitinylierten Bereich, beobachtet werden (s. Abb. 3.16 oben). Die Co-Transfektion von Parkin mit BAGΔC verhielt sich in beiden Konditionen ähnlich der alleinigen Parkin-Überexpression (s. Abb. 3.16 oben).

Zur Objektivierung der Aggregatauszählung wurden des Weiteren Dot-Blot-Analysen durchgeführt. Hierbei werden Proteinlysate direkt auf eine Nitrozellulosemembran aufgetragen. Größere Aggregate können somit, anders als im Western Blot, aufgetragen werden. Für den Dot Blot wurden erneut HEK293-Zellen mit Parkin, BAG1 und BAGAC überexprimiert. Auch hier wurde ein quantitativ stärkeres Signal bei der Co-Transfektion von Parkin und BAG1 im Vergleich zu den anderen beiden Konditionen sichtbar (s. Abb. 3.16 unten). Bei einer Inkubation der HEK293-Zellen mit dem Proteasom-Inhibitor MG 132 für 12 Std konnten die Ergebnisse noch verstärkt werden (Daten nicht gezeigt).

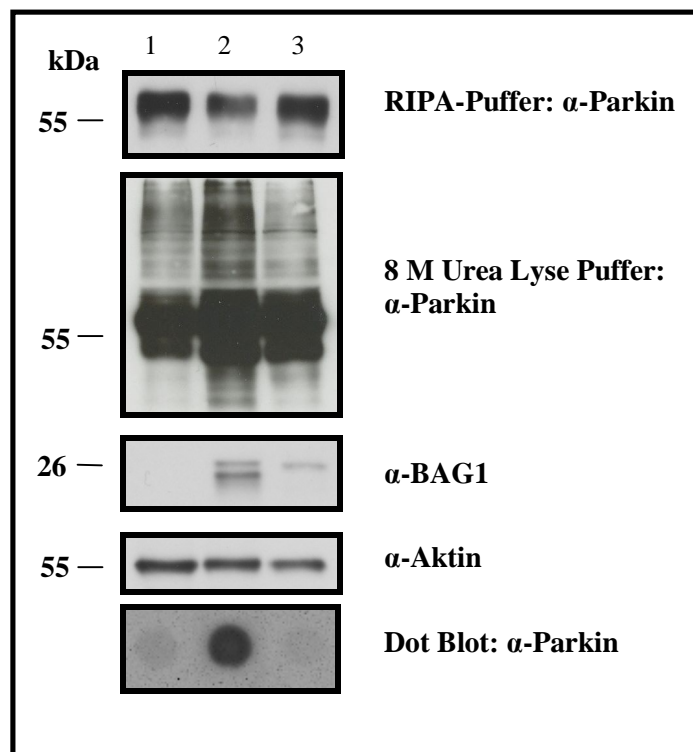


Abb. 3.16: Immunublot zur Darstellung des Aggregationsverhalten von Parkin bei verschiedenen Konditionen. HEK293-Zellen wurden mit RIPA- bzw. 8 M Urea-Puffer lysiert und mittels Western Blot (oberen vier Abbildungen) und Dot Blot (untere Abbildung) analysiert. 1: Parkin+pcDNA-LV; 2: Parkin+BAG1; 3: Parkin+BAGAC.

Anhand dieser Experimente konnte gezeigt werden, dass BAG1 zu einer verstärkten Ubiquitinylierung von Parkin führt. Diese Ubiquitinylierung führt zu einer verstärkten Akkumulation des Proteins und Anhäufung in zytoplasmatische Aggregate. Diese Beobachtungen lassen sich auch verstärkt bei der Inhibition des Proteasoms durch MG 132 darstellen. Die Deletionsmutante BAGAC verliert diesen Einfluss auf Parkin.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, eine Interaktion zwischen Parkin und BAG1 darzustellen, die interagierende Domäne näher zu beschreiben, sowie Auswirkungen von BAG1 auf die Funktionalität der E3-Ligase und eine mögliche BAG1-vermittelte Veränderung in der Ubiquitinylierung und Löslichkeit von Parkin zu untersuchen.

Parkin spielt als Bestandteil des UPS eine entscheidende Rolle bei der Entstehung des autosomal-rezessiv vererbten MP, aber auch bei der Pathogenese des sporadischen MP gewinnt dieses Protein immer mehr an Bedeutung. BAG1 unterstützt als ein Cochaperon von Hsp70 die Re-Faltung fehlerhafter Proteine.

Über die Identifikation einer neuen Interaktion zwischen den zellulären Faltungshelfern und dem UPS sollten so Rückschlüsse über den Einfluss von BAG1 auf die Pathogenese des sporadischen MP gezogen werden.

4.1 Identifikation von BAG1 als neuem Parkin-Interaktor

Die Zelle hat verschiedene Möglichkeiten, mit fehlgefalteten Proteinen umzugehen. Zum einen können mutierte oder beschädigte Proteine, die sich nicht in eine korrekte Faltung überführen lassen, mit Hilfe des UPS selektiv eliminiert werden. Alternativ kommt die Entfaltung und Wiederherstellung der korrekten Proteinstruktur durch Chaperone wie Hsp70 zum Einsatz (Sherman und Goldberg 2001). Diese beiden Mechanismen sind jedoch keine unabhängigen Prozesse, sondern sind an verschiedenen Stellen verbunden. Die ATPase-Untereinheit des 26S-Proteasoms scheint neben der proteolytischen auch eine chaperon-ähnliche Funktion zu besitzen (Braun et al. 1999). Zudem sind die Chaperone Hsp70 und Hsp40 essentiell für die Ubiquitinylierung und schnelle Degradation von fehlerhaften Proteinen (Lee et al. 1996). Auch Cochaperone, wie die Mitglieder der BAG-Familie, wurden in etlichen Studien bereits als Bindeglieder zwischen diesen beiden Systemen beschrieben. So interagiert beispielsweise BAG5 mit Parkin und dem Cochaperon CHIP, das auch über eine E3-Ligase-Funktion verfügt (Kalia SK et al. 2004, Kalia LV et al. 2011). Auch für BAG2 konnte eine Interaktion mit CHIP nachgewiesen werden (Arndt et al. 2005). Für BAG1 sind ebenfalls Verbindungen zum UPS beschrieben. Über die UBL-Domäne bindet BAG1 direkt an das Proteasom (Alberti et al. 2002, Demand et al. 2001); auf die E3-Ligasen CHIP und Siah 1 übt BAG1 einen regulatorischen Effekt aus (Demand et al. 2001, Matsuzawa et al. 1998). Auch für das mit dem erblichen Morbus Parkinson-assoziierte Protein DJ-1 konnte

eine Interaktion mit BAG1 beschrieben (Deeg et al. 2010) und so eine mögliche Rolle der BAG-Proteine in der Pathophysiologie des MP dokumentiert werden.

Mit der in Kapitel 3.1.1 (s. S. 40) dargestellten Interaktion zwischen der E3-Ligase Parkin und den Cochaperon BAG1 ist es gelungen, eine weitere Schnittstelle zwischen dem Chaperon- und Ubiquitin-Proteasom-System zu identifizieren.

Die Bindung der beiden Proteine konnte in Co-Immunopräzipitations-Versuchen sowohl zwischen Parkin und FLAG-BAG1, als auch reziprok, d.h. über die Präzipitation von FLAG-Parkin und anschließender Detektion von BAG1, dargestellt werden. Unspezifische Bindungen über das FLAG-tag konnten somit weitestgehend ausgeschlossen werden.

Des Weiteren konnte mit den vorliegenden Experimenten gezeigt werden, dass auch die BAG1-Deletionsmutante BAG Δ C noch die Fähigkeit besitzt, an Parkin zu binden (s. Kap. 3.1.1, S. 41). Die BAG-Domäne scheint daher nicht entscheidend für diese Interaktion zu sein, da BAG Δ C in dieser Region deletiert ist.

Die bereits in Co-Immunopräzipitations-Versuchen dargestellte Interaktion konnte auch durch eine Co-Lokalisation in neuronalen CSM14.1-Zellen mittels Immunozytochemie bestätigt werden. Parkin wurde bei der Überexpression, wie bereits in der Literatur beschrieben, vor allem zytoplasmatisch dargestellt (Shimura et al. 1999, Stichel et al. 2000). BAG1 zeigte neben einer zytoplasmatischen auch eine nukleäre Lokalisation, wie bereits von Liman et al. postuliert (Liman et al. 2005). Im Zytoplasma konnte eine Co-Lokalisation von Parkin und BAG1 durch eine Überlagerung der Farbsignale bestätigt werden (s. Kap. 3.1.2, S. 42 ff). Eine Veränderung der zellulären Lokalisation der beiden Proteine bei gleichzeitiger Überexpression ließ sich nicht beobachten.

Auch mit BAG Δ C konnte die Interaktion mit Parkin durch eine zytoplasmatische Co-Lokalisation in CSM14.1-Zellen verifiziert werden (s. Kap. 3.1.2, S. 44). BAG Δ C verliert jedoch durch den Verlust der BAG-Domäne am C-Terminus seine Fähigkeit, sich im Nukleus anzureichern (Liman et al. 2005).

4.2 Beurteilung der Kartierungsexperimente zur Identifikation der interagierenden Parkin-Domäne

Die Kartierungsexperimente dienten zur Identifizierung der mit BAG1 interagierenden Parkin-Domäne. Die dargestellten Co-Immunopräzipitations-Versuche erfolgten mit klonierten FLAG-Parkin-Deletionsmutanten und BAG1. Mit den N-terminal deletierten Mutanten, denen die UBL-, bzw. zusätzlich noch die Linker- und RING1-Domäne fehlte, konnte eine Interaktion mit BAG1 dargestellt werden. Einzig mit der kleinsten Deletionsmutante, FLAG- Δ IBR-Parkin, die nur noch aus der C-terminalen zweiten RING-Domäne besteht, konnte kein BAG1-Signal detektiert werden. Da jedoch bereits bei der Expression im Western Blot diese Deletionsmutante nicht darstellbar war, kann nicht automatisch darauf geschlossen werden, dass Parkin über die IBR-Domäne mit BAG1 interagiert (s. Kap. 3.2.5, S. 47 ff). Deletionsproteinen fehlt es oft an den für eine native Faltung essentiellen AS (Winkelhofer et al. 2003). Sie werden daher ebenso wie fehlgefaltete Proteine schnell über die zellulären Abbauwege degradiert. Da die FLAG- Δ IBR-Mutante stark trunkiert ist und nur noch 70 der ursprünglichen 465 Aminosäuren des Parkin-Proteins enthält, könnte daher eine fehlerhafte Faltung ursächlich für die fehlende Expression sein.

Ein weiteres Problem bei der Beurteilung dieses Experimentes stellt die Tatsache dar, dass die klonierten Parkin-Deletionsmutanten rekombinante Proteine sind, die durch eine eventuell veränderte Faltung in vitro, auch über variierte Bindungseigenschaften verfügen können (Dächsel et al. 2005).

Zu einer quantitativen Untersuchung der Bindungsaffinität können Co-Immunopräzipitationsversuche zudem nur bedingt herangezogen werden. Neben der Bindungsstärke könnte etwa auch eine verstärkte Aggregation der Deletionsmutanten Einfluss auf die Bandenstärke im Western Blot haben (Dächsel et al. 2005).

Eine abschließende Bewertung des Experimentes kann aufgrund der oben genannten Gründe nur schwer erfolgen und eine eindeutige interagierende Parkin-Domäne konnte entgegen der Erwartung nicht identifiziert werden. Aufgrund der jeweils N-terminal deletierten Mutanten kann jedoch vermutet werden, dass die Bindungsstelle von BAG1 im Bereich des C-Terminus zu finden ist.

4.3 BAG1 inhibiert die E3-Ligase-Funktion von Parkin

Ein regulatorischer Einfluss von BAG-Proteinen auf E3-Ligasen konnte bereits in zahlreichen Studien dargestellt werden. Für BAG5, BAG2 und auch BAG1 wurden bereits inhibierende Effekte auf die Aktivität von verschiedenen E3-Ligasen wie Parkin und CHIP bzw. Siah 1 beschrieben (Arndt et al. 2005, Chung und Dawson 2004, Kalia SK et al. 2004, Kalia LV et al. 2011, Matsuzawa et al. 1998). BAG3 scheint zudem die proteasomale Degradation von Hsp70 abhängigen Proteinen zu hemmen (Doong et al. 2003). Eine andere Studie zeigte, dass BAG1 den CHIP-vermittelten Abbau des Glukokortikoid-Rezeptors, einem Substrat von CHIP stimuliert (Demand et al. 2001). Erst kürzlich konnte auch gezeigt werden, dass das Verhältnis von BAG1 und BAG3 entscheidend für eine Inhibition der proteasomalen Degradation ist und zu einer Verschiebung hin zu anderen Abbauwegen führt (Gamerding et al. 2009). Folglich scheinen Cochaperone, die eine BAG-Domäne besitzen, häufige Modulatoren von E3-Ligasen zu sein.

Über Co-Immunopräzipitations- und Cycloheximid-Versuche konnte mit dem Substratprotein CDCrel-1 dargestellt werden, dass BAG1, ähnlich wie BAG5, einen inhibierenden Effekt auf die Aktivität von Parkin hat. Bei Anwesenheit von BAG1 konnte eine verminderte Parkin-vermittelte Ubiquitylierung und Abbaurate von CDCrel-1 dargestellt werden, was ebenso für BAG Δ C gilt (s. Kap. 3.3.1 und 3.3.2, S. 49 ff).

Der genaue Mechanismus, über den BAG1 die E3-Ligase-Funktion von Parkin inhibiert, muss noch geklärt werden. Aufgrund der Ergebnisse kann jedoch davon ausgegangen werden, dass eine intakte BAG-Domäne nicht erforderlich ist, da auch BAG Δ C den regulatorischen Effekt auf die E3-Ligase-Funktion ausübt.

Eine mögliche Erklärung für den hemmenden Einfluss postulierten bereits Kalia et al. in ihrer Studie (Kalia SK et al. 2004). Zum einen könnte BAG1 über die Bindung sowie Blockierung der RING-Domäne am C-Terminus die Interaktion zwischen Parkin und den E2-Ligasen stören. Zum anderen könnte auch eine Konformationsänderung des Parkinproteins nach Bindung von BAG1 in einer Inhibition der E3-Ligase-Funktion resultieren (Kalia SK et al. 2004).

Mit dem Protein BAG1 konnte somit ein neuer negativer Regulator der E3-Ligase Parkin identifiziert werden.

Aufgrund der vielfältigen Interaktionen zwischen E3-Ligasen, wie Parkin oder Siah 1 (Matsuzawa et al. 1998) und des regulatorischen Einflusses auf das Chaperon Hsp70 (Liman et al. 2005, Nollen et al. 2001), kann BAG1 möglicherweise als eine Art Vermittlerprotein zwischen dem UPS und dem Chaperonsystem fungieren.

4.4 BAG1 führt zu einer verstärkten Ubiquitinylierung und Akkumulation von Parkin

Die Bedeutung der Proteinaggregation hinsichtlich einer Neurotoxizität oder -protektion, sowie die Rolle bei der Entstehung und Progression von neurodegenerativen Erkrankungen wird bis heute sehr kontrovers diskutiert (Haapasalo et al. 2011, Kalia SK et al. 2004, Sherman und Goldberg 2001, Winner et al. 2011).

Obwohl nur bei wenigen Patienten mit Parkinmutation-assoziierten MP (Davie 2008) Lewy Körper gefunden wurden, konnten zahlreiche Studien eine Aggregation von Parkin in Parkinson-Modellen in vitro zeigen. Eine Ubiquitinylierung von Proteinen scheint daher essentiell für ihre Aggregation zu sein (Ciechanover und Brundin 2003, Junn et al. 2002). Bei etlichen familiären Parkin-Missense-Mutationen konnte zudem eine erhöhte Tendenz zur Aggregatbildung demonstriert werden (Hampe et al. 2006, Henn 2007). Auch eine verstärkte Autoubiquitinylierung dieser Mutanten wurde beobachtet (Sriram et al. 2005). Einige Arbeitsgruppen zeigten zudem, dass Parkin und auch seine Substrate bei proteasomaler Inhibition zu sogenannten Aggresomen akkumulieren (Ardley et al. 2004, Chin et al. 2010, Junn et al. 2002, Um et al. 2010). Aggresomen sind singuläre zytoplasmatische Einschlusskörperchen, die durch eine Akkumulation von Proteinen entlang der Mikrotubuli zum Mikrotubuli-organisierenden Zentrum entstehen (Haapasalo et al. 2011). In ihrer Morphologie ähneln sie den bei Parkinson Patienten gefundenen Lewy Körpern (Junn et al. 2002). Charakteristisch für die Aggresomen sind neben polyubiquitinylierten Proteinen auch Bestandteile des UPS. Aggresomen sind zudem durch einen „Tubulin-Käfig“ vom Rest der Zelle abgeschottet (Ardley et al. 2004). Die Bildung von Aggresomen scheint eine zytoprotektive Antwort zu sein, um mutierte Proteine unschädlich zu machen und abnorme und unspezifische Proteininteraktionen zu verhindern (Haapasalo et al. 2011). Neben einer verminderten proteasomalen Aktivität, etwa durch eine Behandlung mit dem Proteasominhibitor MG 132, können auch einige Proteine die Löslichkeit von Parkin beeinträchtigen. PINK1, ein mit dem erblichem MP assoziiertes Protein, vermindert die Löslichkeit von Parkin (Um et al. 2009). Das Chaperon Hsp70 erhöht dagegen die Löslichkeit von Parkin sowie seiner Mutanten und kann so eine Aggregation vermindern (Rose et al. 2011, Winklhofer et al. 2003). Bei Überexpression von Hsp70 oder auch Hsp40 konnte ein verminderter Anteil von mutierten Proteinen sowie ein verbessertes Zellüberleben in Parkinson-Modellen beschrieben werden (McLean et al. 2004).

Auch über einen Cofaktor von Hsp70 konnte der Einfluss der Chaperone auf die Parkin-Löslichkeit weiter verifiziert werden. So verstärkt BAG5 die Akkumulation von Parkin in

zelluläre Lewy Körper-ähnliche Aggregate, vermutlich über eine Inhibition der Hsp70-Aktivität (Kalia SK et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals BAG1 als Modulator für die Löslichkeit von Parkin mit Hilfe von Western und Dot Blot Analysen sowie Immunozytochemie-Versuchen identifiziert werden. Bereits in den zur Darstellung der Proteininteraktion durchgeführten Versuchen konnten in einigen transfizierten CSM14.1-Zellen zytoplasmatische Aggregate beobachtet werden. In der Literatur wurde bereits beschrieben, dass Parkin bei Überexpression und vor allem bei einer proteasomalen Inhibition zur Bildung von Aggregaten neigt (Junn et al. 2002, Ardley et al. 2004). Diese Beobachtung konnte sowohl bei einer alleinigen Parkin-Überexpression, als auch bei Co-Expression mit BAG1 bzw. BAGAC bestätigt werden (s. Kap. 3.4.2, S. 55 ff). Bei einer Behandlung der Zellen mit dem Proteasominhibitor MG 132 wurden in allen Konditionen verstärkt perinukleäre, Aggresomen-ähnliche Aggregate beobachtet. Die Anwesenheit von BAG1 verstärkte die Parkin-Akkumulation jedoch signifikant. Die von Ardley et al. beschriebene „Abschottung“ der Aggregate durch einen „Tubulinkäfig“ konnte ebenfalls dargestellt werden (Ardley et al. 2004) (s. Abb. 3.13, S. 55).

Neben der vermehrten Akkumulation führt BAG1 auch zu einer verstärkten Ubiquitinylierung von Parkin. Dies bekräftigt die Hypothese, dass die Aggregation an die Ubiquitinylierung des Proteins gekoppelt ist (Ciechanover und Brundin 2003, Junn et al. 2002).

Die oben genannten Ergebnisse sind vor allem interessant für die Frühphase des MP, da die proteasomale Aktivität sich mit den Alter verringert (Goto et al. 2001) und auch bei Parkinson Patienten deutlich vermindert ist (McNaught et al. 2003).

Interessanterweise war jedoch dieser Einfluss auf die Löslichkeit und Ubiquitinylierung von Parkin für BAGAC nicht darstellbar. Es wurde daher vermutet, dass BAG1, ähnlich wie BAG5, diesen Effekt über eine Interaktion mit Hsp70 ausübt (Kalia SK et al. 2004). BAGAC verliert durch die C-terminale Deletionsmutation die Fähigkeit an das Chaperon zu binden (Liman et al. 2005). Auch eine Bindung von Hsp70 selbst an Parkin konnte bereits beschrieben werden (Imai et al. 2002, Winklhofer et al. 2003). Möglich wäre daher auch eine Komplexbildung von Parkin und Hsp70 zusammen mit BAG1.

Wie bereits in zahlreichen Studien beschrieben, agiert BAG1 als Cochaperon von Hsp70 und fördert die Re-Faltung fehlgefalteter Proteine (Gassler et al. 2001, Liman et al. 2005, Takayama et al. 1997). Auf der anderen Seite konnten einige Arbeitsgruppen einen inhibierenden Effekt von BAG1 auf die Hsp70-Aktivität darstellen (Bimston et al. 1998, Nollen et al. 2001). Da BAG1 nur eines der Cochaperone von Hsp70 ist, kann der Effekt auf

die Funktionalität aus einem komplexen Miteinander der verschiedenen Faktoren und der jeweiligen zellulären Situation resultieren. Alternativ könnte BAG1 als eine Art Vermittlermolekül fungieren, das Proteine entweder den zellulären Faltungshelfern oder den Abbau über das Proteasom zuführt.

Es bleibt zudem zu klären, ob die Rekrutierung von Parkin in Aggresomen einen aktiven Prozess der Zelle darstellt, um ubiquitinylierte fehlgefaltete Proteine effektiver abbauen zu können, oder ob Parkin passiv mit anderen ubiquitinylierten Proteinen akkumuliert und so die Funktionalität vermindert wird (Jiang Q et al. 2008). Einige Beobachtungen bekräftigen, dass die Funktionalitätsverminderung zu überwiegen scheint. Die Bedeutung einer Verminderung des Parkingehalts für die Parkinson-Erkrankung konnte schon in einigen Studien verdeutlicht werden. Eine S-Nitrosylations-vermittelte erniedrigte Parkin-Konzentration wurde vor wenigen Jahren als potentielle Verbindung zwischen dem sporadischen und erblichen MP entdeckt (Chung et al. 2004). Auch kann eine Verminderung von Parkin über die Störung des zellulären Gleichgewichtes zu einer Inhibition des Proteasoms führen (Bence et al. 2001, Petrucelli et al. 2002). Die Akkumulation des Parkin-Substrates Synphilin kann beispielsweise direkt in einer Beeinträchtigung des Proteasoms münden (Kalia SK et al. 2004) und eine Verminderung der Parkin-Expression erhöht die Zelltodrate (Petrucelli et al. 2002, Yang Y et al. 2003). Eine leichte Überexpression von Parkin scheint dagegen die mit einer Dysfunktion des UPS verbundenen Neurodegeneration zu verringern (Petrucelli et al. 2002). Möglich wäre jedoch auch, dass die Aggregation und Inhibition von Parkin Hand in Hand gehen.

Zusammenfassend wurde mit BAG1 nicht nur ein möglicher negativer Modulator der E3-Ligase Parkin identifiziert, sondern auch ein Protein, das über die verminderte Löslichkeit von Parkin auch eine Rolle bei der Entstehung und Progression des sporadischen MP spielen kann.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte BAG1 erstmals als Interaktor und Inhibitor der E3-Ligase Parkin identifiziert werden. Sowohl eine verstärkte Ubiquitinylierung als auch verminderte Löslichkeit von Parkin konnten bei Anwesenheit von BAG1 beschrieben werden.

In weiteren Experimenten soll nun untersucht werden, welche Auswirkungen diese Effekte auf das Überleben von dopaminergen Neuronen haben und ob BAG1 einen Einfluss auf den bei MP typischen Zelluntergang hat. Für das BAG5-Protein konnte bereits eine erhöhte Zelltodrate von dopaminergen Neuronen in vivo beschrieben werden (Kalia SK et al. 2004). Auch bleibt weiterhin zu untersuchen, welche Rolle das Chaperon Hsp70 bei der hier beobachteten BAG1-vermittelte Ubiquitinylierung und Akkumulation von Parkin spielt. Des Weiteren soll der Einfluss von BAG1 auf die Funktion und die Löslichkeit von einigen familiären Parkin-Punktmutationen dargestellt werden, um zu untersuchen, welche Rolle BAG1 beim erblichen MP spielt.

In Anbetracht des Einflusses von BAG1 auf die Ubiquitinylierung und Proteinaggregation könnte BAG1 in Zukunft als möglicher pharmakologischer Angriffspunkt bei der Behandlung von neurodegenerativen Erkrankungen, wie MP dienen.

Mit Geldanamycin, einem Antibiotikum, das recht spezifisch Hsp70 induziert und somit vor einer Proteinaggregation in einem Fliegen-Modell der Parkinson-Erkrankung schützt, wurde bereits ein möglicher pharmakologischer Angriffspunkt für eine neuroprotektive Therapie beim MP gefunden (McLean et al. 2004). Auch weitere Substanzen, die in das Chaperon-System eingreifen, werden bereits in präklinischen Studien getestet (Kalia SK et al. 2010).

5 Zusammenfassung

5.1 Deutsch

Parkin spielt als E3-Ligase eine entscheidende Rolle für die Entstehung des autosomal-rezessiv vererbten Morbus Parkinson (MP). Eine Verminderung der Parkin-Aktivität kann auch zum Zelluntergang der dopaminergen Neurone beim sporadischen MP beitragen. *Bcl-2-associated athanogene 1* (BAG1), ein Mitglied der BAG-Familie, wirkt als Cochaperon modulierend auf Hsp70 ein und stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen den zellulären Faltungshelfern und dem Ubiquitin-Proteasom-System dar. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe von Co-Immunopräzipitations- und Immunozytochemie-Versuchen gezeigt werden, dass BAG1 mit Parkin interagiert. Zudem wurde dargestellt, dass BAG Δ C, eine Deletionsmutante von BAG1, die zum Verlust der BAG-Domäne führt, immer noch die Fähigkeit besitzt, mit Parkin zu interagieren. Eine eindeutige wechselwirkende Parkin-Domäne konnte jedoch in Co-Immunopräzipitations-Versuchen nicht verifiziert werden. Mit Hilfe von Western-Blot-Analysen konnte ein inhibierender Effekt von BAG1 auf die E3-Ligase-Funktion von Parkin aufgezeigt werden. BAG1 führte sowohl zu einer verminderten Parkin-vermittelten Abbaurate als auch Ubiquitinylierung des Substratproteins CDCrel-1. Auch für BAG Δ C ließ sich dieser Effekt auf die Parkin-Aktivität nachweisen.

Schließlich konnte in Western- und Dot-Bot-Analysen sowie in Immunozytochemie-Versuchen gezeigt werden, dass BAG1 zu einer verstärkten Ubiquitinylierung und Akkumulation von Parkin in zelluläre Aggregate führt. BAG Δ C hingegen verliert diesen Einfluss auf die Ubiquitinylierung und Löslichkeit von Parkin. Daher wurde vermutet, dass das Chaperon Hsp70, an der verminderten Löslichkeit von Parkin beteiligt ist. BAG Δ C verliert durch die Deletion in der BAG-Domäne die Fähigkeit, mit Hsp70 zu interagieren.

Zusammenfassend konnten wir in dieser Arbeit mit der Interaktion von Parkin und BAG1 eine neue wichtige Verbindung zwischen dem Chaperon- und Ubiquitin-Proteasomsystem darstellen. Diese Ergebnisse bestätigen Beobachtungen, die bereits mit BAG5 und BAG2 erzielt wurden (Arndt et al. 2005, Kalia SK et al. 2004). Wir vermuten daher, dass BAG1 durch die Inhibition von Parkin und die Akkumulation in zelluläre Aggregate eine Rolle bei der Entstehung und Progression des sporadischen MP spielt.

5.2 Englisch

Through its function as an E3 ubiquitin ligase Parkin plays an important role for the development of early-onset Parkinson's disease (PD). Decreased Parkin activity may also contribute to the neurodegeneration of dopaminergic neurons in sporadic forms of PD. As a member of the BAG family Bcl-2-associated athanogen 1 (BAG1) modulates the activity of the chaperon Hsp70 and is an important link between the chaperon and the ubiquitin proteasom system.

In this study, we show via co-immunoprecipitation and immunocytochemistry experiments that BAG1 interacts with Parkin. Furthermore, we demonstrate that BAG Δ C, a BAG1 deletion mutant that misses the BAG domain at the C-terminus, still has the ability to interact with the E3 ligase Parkin. A definite Parkin binding domain could not be verified.

In Western Blot analyses we illustrate an inhibitory effect of BAG1 on the E3 ligase function of Parkin. BAG1 not only leads to decreased levels of the Parkin mediated degradation rate but also to a lower ubiquitylation of the substrate protein CDCrel-1.

Even for BAG Δ C this effect on E3 ligase function could be detected.

Finally, we show that BAG1 leads to an increased level of ubiquitylated Parkin and enhances the accumulation of Parkin into protein aggregates. Interestingly, BAG Δ C lacks this effect. Hence, we hypothesize that the chaperon Hsp70 may be involved in Parkin accumulation due to the inability of BAG Δ C to interact with Hsp70.

In this study, we could demonstrate a new protein interaction between Parkin and BAG1 representing an important link between the chaperon and the ubiquitin-proteasom system. This observation validates results that have already been established with BAG5 and BAG2 (Arndt et al. 2005, Kalia SK et al. 2004). Presumably, BAG1 may be involved in pathogenesis and progression of sporadic forms of PD through the inhibition of Parkin and its accumulation into cellular aggregates.

6 Literaturverzeichnis

- Abbas N, Lücking CB, Ricard S, Dürr A, Bonifati V, De Michele G, Bouley S, Vaughan JR, Gasser T, Marconi R, et al. (1999): A wide variety of mutations in the parkin gene are responsible for autosomal recessive parkinsonism in Europe. French Parkinson's Disease Genetics Study Group and the European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinson's Disease. *Hum Mol Genet*, 8, 567-574
- Alberti S, Demand J, Esser C, Emmerich N, Schild H, Hohfeld J (2002): Ubiquitylation of BAG-1 suggests a novel regulatory mechanism during the sorting of chaperone substrates to the proteasome. *J Biol Chem*, 277, 45920-45927
- Alberti S, Esser C, Höhfeld J (2003): BAG-1-a nucleotide exchange factor of Hsc70 with multiple cellular functions. *Cell Stress Chaperones*, 8, 225-231
- Ardley HC, Scott GB, Rose SA, Tan NG, Robinson PA (2004): UCH-L1 aggresome formation in response to proteasome impairment indicates a role in inclusion formation in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 90, 379-391
- Arndt V, Daniel C, Nastainczyk W, Alberti S, Höhfeld J (2005): BAG-2 acts as an inhibitor of the chaperone-associated ubiquitin ligase CHIP. *Mol Biol Cell*, 16, 5891-5900
- Bardelli A, Longati P, Albero D, Goruppi S, Schneider C, Ponzetto C, Comoglio PM (1996): HGF receptor associates with the anti-apoptotic protein BAG-1 and prevents cell death. *EMBO J*, 15, 6205-6212
- Baumeister W, Walz J, Zühl F, Seemüller E (1998): The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*, 92, 367-380
- Bence NF, Sampat RM, Kopito RR (2001): Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation. *Science*, 292, 1552-1555
- Betarbet R, Sherer TB, Greenamyre JT (2005): Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's diseases. *Exp Neurol*, 191, 17-27
- Biasini E, Fioriti L, Ceglia I, Invernizzi R, Bertoli A, Chiesa R, Forloni G (2004): Proteasome inhibition and aggregation in Parkinson's disease: a comparative study in untransfected and transfected cells. *J Neurochem*, 88, 545-553
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res*, 33, 2643-2652
- Bimston D, Song J, Winchester D, Takayama S, Reed JC, Morimoto RI (1998): BAG-1, a negative regulator of Hsp70 chaperone activity, uncouples nucleotide hydrolysis from substrate release. *EMBO J*, 17, 6871-6878
- Bosboom JL, Stoffers D, Wolters ECh (2004): Cognitive dysfunction and dementia in Parkinson's disease. *J Neural Transm*, 111, 1303-1315
- Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M (1999): The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol*, 1, 221-226

- Burns RS, Chiueh CC, Markey SP, Ebert MH, Jacobowitz DM, Kopin IJ (1983): A primate model of parkinsonism: selective destruction of dopaminergic neurons in the pars compacta of the substantia nigra by N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 80, 4546-4550
- Cesari R, Martin ES, Calin GA, Pentimalli F, Bichi R, McAdams H, Trapasso F, Drusco A, Shimizu M et al. (2003): Parkin, a gene implicated in autosomal recessive juvenile parkinsonism, is a candidate tumor suppressor gene on chromosome 6q25–q27. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 5956-5961
- Chaudhuri KR, Healy DG, Schapira AH (2006): Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*, 5, 235-245
- Cheon SM, Park MJ, Kim WJ, Kim JW (2009): Non-motor off symptoms in Parkinson's disease. *J Korean Med Sci*, 24, 311-314
- Chin LS, Olzmann JA, Li L (2010): Parkin-mediated ubiquitin signalling in aggresome formation and autophagy. *Biochem Soc Trans*, 38, 144-149
- Choi P, Snyder H, Petrucelli L, Theisler C, Chong M, Zhang Y, Lim K, Chung KK, Kehoe K, D'Adamio L, et al. (2003): SEPT5_v2 is a parkin-binding protein. *Brain Res Mol Brain Res*, 117, 179-189
- Chung KK, Dawson TM (2004): Parkin and Hsp70 sacked by BAG5. *Neuron*, 44, 899-901
- Chung KK, Zhang Y, Lim KL, Tanaka Y, Huang H, Gao J, Ross CA, Dawson VL, Dawson TM (2001): Parkin ubiquitinates the alpha-synuclein-interacting protein, synphilin-1: implications for Lewy-body formation in Parkinson disease. *Nat Med*, 7, 1144-1150
- Chung KK, Thomas B, Li X, Pletnikova O, Troncoso JC, Marsh L, Dawson VL, Dawson TM (2004): S-nitrosylation of parkin regulates ubiquitination and compromises parkin's protective function. *Science*, 304, 1328-1331
- Ciechanover A, Brundin P (2003): The ubiquitin proteasome system in neurodegenerative diseases: sometimes the chicken, sometimes the egg. *Neuron*, 40, 427-446
- Corti O, Hampe C, Koutnikova H, Darios F, Jacquier S, Prigent A, Robinson JC, Pradier L, Ruberg M, Mirande M, et al. (2003): The p38 subunit of the aminoacyl-tRNA synthetase complex is a Parkin substrate: linking protein biosynthesis and neurodegeneration. *Hum Mol Genet*, 12, 1427-1437
- Dächsel JC, Lücking CB, Deeg S, Schultz E, Lalowski M, Casademunt E, Corti O, Hampe C, Patenge N, Vaupel K et al. (2005): Parkin interacts with the proteasome subunit alpha4. *FEBS Lett*, 579, 3913-3919
- Damier P, Hirsch EC, Agid Y, Graybiel AM (1999): The substantia nigra of the human brain. II. Patterns of loss of dopamine-containing neurons in Parkinson's disease. *Brain*, 122, 1437-1448
- Dauer W, Przedborski S (2003): Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron*, 39, 889-909
- Davie CA (2008): A review of Parkinson's disease. *Br Med Bull*, 86, 109-127

- Davis GC, Williams AC, Markey SP, Ebert MH, Caine ED, Reichert CM, Kopin IJ (1979): Chronic Parkinsonism secondary to intravenous injection of meperidine analogues. *Psychiatry Res*, 1, 249-254
- Deeg S, Gralle M, Sroka K, Bähr M, Wouters FS, Kermer P (2010): BAG1 restores formation of functional DJ-1 L166P dimers and DJ-1 chaperone activity. *J Cell Biol*, 188, 505-513
- Demand J, Alberti S, Patterson C, Höhfeld J (2001): Cooperation of a ubiquitin domain protein and an E3 ubiquitin ligase during chaperone/proteasome coupling. *Curr Biol*, 11, 1569-1577
- Doong H, Vrailas A, Kohn EC (2002): What's in the 'BAG'? – a functional domain analysis of the BAG-family proteins. *Cancer Lett*, 188, 25-32
- Doong H, Rizzo K, Fang S, Kulpa V, Weissman AM, Kohn EC (2003): CAIR-1/BAG-3 abrogates heat shock protein-70 chaperone complex-mediated protein degradation: accumulation of poly-ubiquitinated Hsp90 client proteins. *J Biol Chem*, 278, 28490-28500
- Durand MM, Chugani DC, Mahmoudi M, Phelps ME (1990): Characterization of neuron- like cell line immortalized from primary rat mesencephalon cultures. *Soc Neurosci Abstr*, 16, 40
- Dusonchet J, Bensadoun JC, Schneider BL, Aebischer P (2009): Targeted overexpression of the parkin substrate Pael-R in the nigrostriatal system of adult rats to model Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, 35, 32-41
- Elliott E, Tsvetkov P, Ginzburg I (2007): BAG-1 associates with Hsc70.Tau complex and regulates the proteasomal degradation of Tau protein. *J Biol Chem*, 282, 37276-37284
- Elliott E, Laufer O, Ginzburg I (2009): BAG-1M is up-regulated in hippocampus of Alzheimer's disease patients and associates with tau and APP proteins. *J Neurochem*, 109, 1168-1178
- Exner N, Treske B, Paquet D, Holmström K, Schiesling C, Gispert S, Carballo-Carbajal I, Berg D, Hoepken HH (2007): Loss-of-function of human PINK1 results in mitochondrial pathology and can be rescued by parkin. *J Neurosci*, 27, 12413-12418
- Fallon L, Moreau F, Croft BG, Labib N, Gu WJ, Fon EA (2002): Parkin and CASK/LIN-2 associate via a PDZ-mediated interaction and are co-localized in lipid rafts and postsynaptic densities in brain. *J Biol Chem*, 277, 486-491
- Froesch BA, Takayama S, Reed JC (1998): BAG-1L protein enhances androgen receptor function. *J Biol Chem*, 273, 11660-11666
- Gamerding M, Hajieva P, Kaya AM, Wolfrum U, Hartl FU, Behl C (2009): Protein quality control during aging involves recruitment of the macroautophagy pathway by BAG3. *EMBO J*, 28, 889-901
- Gandhi S, Muqit MM, Stanyer L, Healy DG, Abou-Sleiman PM, Hargreaves I, Heales S, Ganguly M, Parsons L, Lees AJ, et al. (2006): PINK1 protein in normal human brain and Parkinson's disease. *Brain*, 129, 1720-1731
- Gassler CS, Wiederkehr T, Brehmer D, Bukau B, Mayer MP (2001): Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor. *J Biol Chem*, 276, 32538-32544

- Giasson BI and Lee VM (2001): Parkin and the Molecular Pathways of Parkinson's Disease. *Neuron*, 31, 885-888
- Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D (1998): A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*, 94, 615-623
- Goto S, Takahashi R, Kumiyama AA, Radák Z, Hayashi T, Takenouchi M, Abe R (2001): Implications of protein degradation in aging. *Ann N Y Acad Sci*, 928, 54-64
- Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R (1977): Characteristics of a Human Cell Line Transformed by DNA from Human Adenovirus Type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74
- Greenamyre JT, Sherer TB, Betarbet R, Panov AV (2001): Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life*, 52, 135-141
- Haapasalo A, Viswanathan J, Kurkinen KM, Bertram L, Soininen H, Dantuma NP, Tanzi RE, Hiltunen M (2011): Involvement of ubiquilin-1 transcript variants in protein degradation and accumulation. *Commun Integr Biol*, 4, 428-432
- Hald A, Lotharius J (2005): Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Exp Neurol*, 193, 279-290
- Hampe C, Ardila-Osorio H, Fournier M, Brice A, Corti O (2006): Biochemical analysis of Parkinson's disease-causing variants of Parkin, an E3 ubiquitin-protein ligase with monoubiquitylation capacity. *Hum Mol Genet*, 15, 2059-2075
- Hancock DB, Martin ER, Mayhew GM, Stajich JM, Jewett R, Stacy MA, Scott BL, Vance JM, Scott WK (2008): Pesticide exposure and risk of Parkinson's disease: a family-based case-control study. *BMC Neurol*, 8, 6
- Henn IH: Die Rolle von Parkin bei der Parkinson-Erkrankung: Physiologische Funktion und Mechanismen der Inaktivierung. *Pharm. Diss. München* 2007
- Hernán MA, Takkouche B, Caamaño-Isorna F, Gestal-Otero JJ (2002): A meta-analysis of coffee drinking, cigarette smoking, and the risk of Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 52, 276-284
- Herrera AJ, Tomás-Camardiel M, Venero JL, Cano J, Machado A (2005): Inflammatory process as a determinant factor for the degeneration of substantia nigra dopaminergic neurons. *J Neural Transm*, 112, 111-119
- Hicke L (1999): Gettin' down with ubiquitin: turning off cell-surface receptors, transporters and channels. *Trends Cell Biol*, 9, 107-112
- Hicke L (2001): Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 195-201
- Hochstrasser M (1996): Ubiquitin-dependent protein degradation. *Annu Rev Genet*, 30, 405-439
- Horowitz JM, Myers J, Stachowiak MK, Torres G (1999): Identification and distribution of Parkin in rat brain. *Neuroreport*, 10, 3393-3397
- Hristova VA, Beasley SA, Rylett RJ, Shaw GS (2009): Identification of a novel Zn²⁺-binding domain in the autosomal recessive juvenile Parkinson-related E3 ligase parkin. *J Biol Chem*, 284, 14978-14986

- Huynh DP, Scoles DR, Ho TH, Del Bigio MR, Pulst SM (2000): Parkin is associated with actin filaments in neuronal and nonneuronal cells. *Ann Neurol*, 48, 737-744
- Huynh DP, Scoles DR, Nguyen D, Pulst SM (2003): The autosomal recessive juvenile Parkinson disease gene product, parkin, interacts with and ubiquitinates synaptotagmin XI. *Hum Mol Genet*, 12, 2587-2597
- Huynh DP, Nguyen DT, Pulst-Korenberg JB, Brice A, Pulst SM (2007): Parkin is an E3 ubiquitin-ligase for normal and mutant ataxin-2 and prevents ataxin-2-induced cell death. *Exp Neurol*, 203, 531-541
- Imai Y, Soda M, Takahashi R (2000): Parkin suppresses unfolded protein stress-induced cell death through its E3 ubiquitin-protein ligase activity. *J Biol Chem*, 275, 35661-35664
- Imai Y, Soda M, Inoue H, Hattori N, Mizuno Y, Takahashi R (2001): An unfolded putative transmembrane polypeptide, which can lead to endoplasmic reticulum stress, is a substrate of Parkin. *Cell*, 105, 891-902
- Imai Y, Soda M, Hatakeyama S, Akagi T, Hashikawa T, Nakayama KI, Takahashi R (2002): CHIP is associated with Parkin, a gene responsible for familial Parkinson's disease, and enhances its ubiquitin ligase activity. *Mol Cell*, 10, 55-67
- Ishikawa A, Tsuji S (1996): Clinical analysis of 17 patients in 12 Japanese families with autosomal-recessive type juvenile parkinsonism. *Neurology*, 47, 160-166
- Jiang H, Jiang Q, Feng J (2004): Parkin increases dopamine uptake by enhancing the cell surface expression of dopamine transporter. *J Biol Chem*, 279, 54380-54386
- Jiang Q, Ren Y, Feng J (2008): Direct binding with histone deacetylase 6 mediates the reversible recruitment of parkin to the centrosome. *J Neurosci*, 28, 12993-13002
- Junn E, Lee SS, Suhr UT, Mouradian MM (2002): Parkin accumulation in aggresomes due to proteasome impairment. *J Biol Chem*, 277, 47870-47877
- Kahle PJ, Haass C (2004): How does parkin ligate ubiquitin to Parkinson's disease? *EMBO Rep*, 5, 681-685
- Kalia LV, Kalia SK, Chau H, Lozano AM, Hyman BT, McLean PJ (2011): Ubiquitinylation of α -synuclein by carboxyl terminus Hsp70-interacting protein (CHIP) is regulated by Bcl-2-associated athanogene 5 (BAG5). *PLoS One*, 6, 14695
- Kalia SK, Lee S, Smith PD, Liu L, Crocker SJ, Thorarinsdottir TE, Glover JR, Fon EA, Park DS, Lozano AM (2004): BAG5 inhibits parkin and enhances dopaminergic neuron degeneration. *Neuron*, 44, 31-45
- Kalia SK, Kalia LV, McLean PJ (2010): Molecular chaperones as rational drug targets for Parkinson's disease therapeutics. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 9, 741-753
- Karow T, Lang-Roth R: *Pharmakologie und Toxikologie*, 18. Auflage, Eigenverlag, Köln 2010
- Kermer P, Krajewska M, Zapata JM, Takayama S, Mai J, Krajewski S, Reed JC (2002): Bag1 is a regulator and marker of neuronal differentiation. *Cell Death Differ*, 9, 405-413

- Kermer P, Digicaylioglu MH, Kaul M, Zapata JM, Krajewska M, Stenner-Liewen F, Takayama S, Krajewski S, Lipton SA, Reed JC (2003): BAG1 over-expression in brain protects against stroke. *Brain Pathol*, 13, 495-506
- Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, Yokochi M, Mizuno Y, Shimizu N (1998): Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392, 605-608
- Kitada T, Asakawa S, Minoshima S, Mizuno Y, Shimizu N (2000): Molecular cloning, gene expression, and identification of a splicing variant of the mouse parkin gene. *Mamm Genome*, 11, 417-421
- Ko HS, Kim SW, Sriram SR, Dawson VL, Dawson TM (2006): Identification of far upstream element-binding protein-1 as an authentic Parkin substrate. *J Biol Chem*, 281, 16193-16196
- Kubo SI, Kitami T, Noda S, Shimura H, Uchiyama Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Mizuno Y, Hattori N (2001): Parkin is associated with cellular vesicles. *J Neurochem*, 78, 42-54
- Kullmann M, Schneikert J, Moll J, Heck S, Zeiner M, Gehring U, Cato AC (1998): RAP46 is a negative regulator of glucocorticoid receptor action and hormone-induced apoptosis. *J Biol Chem*, 273, 14620-14625
- Lang AE, Lozano AM (1998a): Parkinson's Disease-First of Two Parts, *N Engl J Med*, 339, 1044-1053
- Lang AE, Lozano AM (1998b): Parkinson's disease. Second of two parts. *N Engl J Med*, 339, 1130-1143
- Langston JW (1998): Epidemiology versus genetics in Parkinson's disease: progress in resolving an age-old debate. *Ann Neurol*, 44, 45-52
- Lee DH, Sherman MY, Goldberg AL (1996): Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 16, 4773-4781
- Lees AJ, Hardy J, Revesz T (2009): Parkinson's disease. *Lancet*, 373, 2055-2066
- Lesage S, Brice A (2009): Parkinson's disease: from monogenic forms to genetic susceptibility factors. *Hum Mol Genet*, 18, 48-59
- Li Y, Wan OW, Xie W, Chung KK (2011): p32 regulates mitochondrial morphology and dynamics through parkin. *Neuroscience*, [Epub ahead of print]
- Lim KL, Tan JM (2007): Role of the ubiquitin proteasome system in Parkinson's disease. *BMC Biochem*, 8, 13
- Lim KL, Dawson VL, Dawson TM (2003): The cast of molecular characters in Parkinson's disease: felons, conspirators, and suspects. *Ann N Y Acad Sci*, 991, 80-92
- Liman J, Ganesan S, Dohm CP, Krajewski S, Reed JC, Bähr M, Wouters FS, Kermer P (2005): Interaction of BAG1 and Hsp70 mediates neuroprotectivity and increases chaperone activity. *Mol Cell Biol*, 25, 3715-3725

- Lin J, Hutchinson L, Gaston SM, Raab G, Freeman MR (2001): BAG-1 is a novel cytoplasmic binding partner of the membrane form of heparin-binding EGF-like growth factor: a unique role for proHB-EGF in cell survival regulation. *J Biol Chem*, 276, 30127-30132
- Lin TK, Liou CW, Chen SD, Chuang YC, Tiao MM, Wang PW, Chen JB, Chuang JH (2009): Mitochondrial dysfunction and biogenesis in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Chang Gung Med J*, 32, 589-599
- Liu R, Takayama S, Zheng Y, Froesch B, Chen GQ, Zhang X, Reed JC, Zhang XK (1998): Interaction of BAG-1 with retinoic acid receptor and its inhibition of retinoic acid-induced apoptosis in cancer cells. *J Biol Chem*, 273, 16985-16992
- Lücking CB, Dürr A, Bonifati V, Vaughan J, De Michele G, Gasser T, Harhangi BS, Meco G, Denèfle P, Wood NW, et al. (2000): French Parkinsons Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinsons Disease. Association between early-onset Parkinsons disease and mutations in the parkin gene. *N Engl J Med*, 342, 1560-1567
- Matsuzawa S, Takayama S, Froesch BA, Zapata JM, Reed JC (1998): p53-inducible human homologue of *Drosophila* seven in absentia (Siah) inhibits cell growth: suppression by BAG-1. *EMBO J*, 17, 2736-2747
- McLean PJ, Klucken J, Shin Y, Hyman BT (2004): Geldanamycin induces Hsp70 and prevents alpha-synuclein aggregation and toxicity in vitro. *Biochem Biophys Res Commun*, 321, 665-669
- McNaught KS, Belizaire R, Isacson O, Jenner P, Olanow CW (2003): Altered proteasomal function in sporadic Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 179, 38-46
- Mizuno Y, Hattori N, Kubo S, Sato S, Nishioka K, Hatano T, Tomiyama H, Funayama M, Machida Y, Mochizuki H (2008): Progress in the pathogenesis and genetics of Parkinson's disease. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 363, 2215-2227
- Moore DJ, Zhang L, Troncoso J, Lee MK, Hattori N, Mizuno Y, Dawson TM, Dawson VL (2005): Association of DJ-1 and parkin mediated by pathogenic DJ-1 mutations and oxidative stress. *Hum Mol Genet*, 14, 71-84
- Nicklas WJ, Youngster SK, Kindt MV, Heikkila RE (1987): MPTP, MPP⁺ and mitochondrial function. *Life Sci*, 40, 721-729
- Nollen EA, Kabakov AE, Brunsting JF, Kanon B, Höhfeld J, Kampinga HH (2001): Modulation of in vivo HSP70 chaperone activity by Hip and Bag-1. *J Biol Chem*, 276, 4677-4682
- Novoselov SS, Novoselova TV, Verbova MV, Margulis BA, Guzhova IV (2005): The balance between Hsp70 and its cochaperones Hdj1 and Bag1 determines its substrate-binding activity. *Tsitologiya*, 47, 220-229
- Nuytemans K, Theuns J, Cruts M, Van Broeckhoven C (2010): Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat*, 31, 763-780
- Olanow CW, McNaught KS (2006): Ubiquitin-proteasome system and Parkinson's disease. *Mov Disord*, 21, 1806-1823
- Parkinson J (2002): An essay on the shaking palsy. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci*, 14, 223-236

- Periquet M, Latouche M, Lohmann E, Rawal N, De Michele G, Ricard S, Teive H, Fraix V, Vidailhet M, Nicholl D, et al. (2003): French Parkinsons Disease Genetics Study Group; European Consortium on Genetic Susceptibility in Parkinsons Disease. Parkin mutations are frequent in patients with isolated early-onset parkinsonism. *Brain*, 126, 1271-1278
- Petrucelli L, O'Farrell C, Lockhart PJ, Baptista M, Kehoe K, Vink L, Choi P, Wolozin B, Farrer M, Hardy J, Cookson MR (2002): Parkin protects against the toxicity associated with mutant alpha-synuclein: proteasome dysfunction selectively affects catecholaminergic neurons. *Neuron*, 36, 1007-1019
- Ren Y, Zhao J, Feng J (2003): Parkin Binds to α/β Tubulin and Increases their Ubiquitination and Degradation. *J Neurosci*, 23, 3316-3324
- Robzyk K, Recht J, Osley MA (2000): Rad6-dependent ubiquitination of histone H2B in yeast. *Science*, 287, 501-504
- Rose JM, Novoselov SS, Robinson PA, Cheetham ME (2011): Molecular chaperone-mediated rescue of mitophagy by a Parkin RING1 domain mutant. *Hum Mol Genet*, 20, 16-27
- Safadi SS, Shaw GS (2010): Differential interaction of the E3 ligase parkin with the proteasomal subunit S5a and the endocytic protein Eps15. *J Biol Chem*, 285, 1424-1434
- Sakata E, Yamaguchi Y, Kurimoto E, Kikuchi J, Yokoyama S, Yamada S, Kawahara H, Yokosawa H, Hattori N, Mizuno Y et al. (2003): Parkin binds the Rpn10 subunit of 26S proteasomes through its ubiquitin-like domain. *EMBO Rep*, 4, 301-306
- Schlossmacher MG, Frosch MP, Gai WP, Medina M, Sharma N, Forno L, Ochiishi T, Shimura H, Sharon R, Hattori N, et al. (2002): Parkin localizes to the Lewy bodies of Parkinson disease and dementia with Lewy bodies. *Am J Pathol*, 160, 1655-1667
- Sherman MY, Goldberg AL (2001): Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron*, 29, 15-32
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Yoshikawa M, Kitada T, Matsumine H, Asakawa S, Minoshima S, Yamamura Y, Shimizu N, Mizuno Y (1999): Immunohistochemical and subcellular localization of Parkin protein: absence of protein in autosomal recessive juvenile parkinsonism patients. *Ann Neurol*, 45, 668-672
- Shimura H, Hattori N, Kubo S, Mizuno Y, Asakawa S, Minoshima S, Shimizu N, Iwai K, Chiba T, Tanaka K, Suzuki T (2000): Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nat Genet*, 25, 302-305
- Shimura H, Schlossmacher MG, Hattori N, Frosch MP, Trockenbacher A, Schneider R, Mizuno Y, Kosik KS, Selkoe DJ (2001): Ubiquitination of a new form of alpha-synuclein by parkin from human brain: implications for Parkinson's disease. *Science*, 293, 263-269
- Sian J, Dexter DT, Lees AJ, Daniel S, Agid Y, Javoy-Agid F, Jenner P, Marsden CD (1994): Alterations in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affecting basal ganglia. *Ann Neurol*, 36, 348-355
- Simón-Sánchez J, Schulte C, Bras JM, Sharma M, Gibbs JR, Berg D, Paisan-Ruiz C, Lichtner P, Scholz SW, Hernandez DG, et al. (2009): Genome-wide association study reveals genetic risk underlying Parkinson's disease. *Nat Genet*, 41, 1308-1312

- Smith WW, Pei Z, Jiang H, Moore DJ, Liang Y, West AB, Dawson VL, Dawson TM, Ross CA (2005): Leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) interacts with parkin, and mutant LRRK2 induces neuronal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 18676-18681
- Song J, Takeda M, Morimoto RI (2001): Bag1-Hsp70 mediates a physiological stress signalling pathway that regulates Raf-1/ERK and cell growth. *Nat Cell Biol*, 3, 276-282
- Sriram SR, Li X, Ko HS, Chung KK, Wong E, Lim KL, Dawson VL, Dawson TM (2005): Familial-associated mutations differentially disrupt the solubility, localization, binding and ubiquitination properties of parkin. *Hum Mol Genet*, 14, 2571-2586
- Sroka, K: Huntingtin toxicity is ameliorated by BAG1 through modulation of its aggregation, degradation and subcellular distribution. *Biol. Diss. Göttingen* 2008
- Spillantini MG, Crowther RA, Jakes R, Hasegawa M, Goedert M (1998): alpha-Synuclein in filamentous inclusions of Lewy bodies from Parkinson's disease and dementia with lewy bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6469-6473
- Staropoli JF, McDermott C, Martinat C, Schulman B, Demireva E, Abeliovich A (2003): Parkin is a component of an SCF-like ubiquitin ligase complex and protects postmitotic neurons from kainate excitotoxicity. *Neuron*, 37, 735-749
- Stichel CC, Augustin M, Kühn K, Zhu XR, Engels P, Ullmer C, Lübbert H (2000): Parkin expression in the adult mouse brain. *Eur J Neurosci*, 12, 4181-4194
- Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Millan JA, and Reed JC (1995): Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, 80, 279-284
- Takayama S, Bimston DN, Matsuzawa S, Freeman BC, Aime-Sempe C, Xie Z, Morimoto RI, Reed JC (1997): BAG-1 modulates the chaperone activity of Hsp70/Hsc70. *EMBO J*, 16, 4887-4896
- Takayama S, Krajewski S, Krajewska M, Kitada S, Zapata JM, Kochel K, Knee D, Scudiero D, Tudor G, Miller GJ, et al. (1998): Expression and location of Hsp70/Hsc-binding anti-apoptotic protein BAG-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines. *Cancer Res*, 58, 3116-3131
- Takayama S, Xie Z, Reed JC (1999): An evolutionarily conserved family of Hsp70/Hsc70 molecular chaperone regulators. *J Biol Chem*, 274, 781-786
- Thomas B, Beal MF (2007): Parkinson`s disease. *Hum Mol Genet*, 16, 183-94
- Um JW, Min DS, Rhim H, Kim J, Paik SR, Chung KC (2006): Parkin ubiquitinates and promotes the degradation of RanBP2. *J Biol Chem*, 281, 3595-3603
- Um JW, Stichel-Gunkel C, Lübbert H, Lee G, Chung KC (2009): Molecular interaction between parkin and PINK1 in mammalian neuronal cells. *Mol Cell Neurosci*, 40, 421-432
- Um JW, Park HJ, Song J, Jeon I, Lee G, Lee PH, Chung KC (2010): Formation of parkin aggregates and enhanced PINK1 accumulation during the pathogenesis of Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 393, 824-828
- Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MM, Harvey K, Gispert S, Ali Z, Del Turco D, Bentivoglio AR, Healy DG, et al. (2004): Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science*, 304, 1158-1160

- Van Humbeeck C, Cornelissen T, Vandenberghe W (2011): Ambra1: A Parkin-binding protein involved in mitophagy. *Autophagy*, [Epub ahead of print]
- Volkman J (2004): Deep brain stimulation for the treatment of Parkinson's disease. *J Clin Neurophysiol*, 21, 6-17
- von Coelln R, Dawson VL, Dawson TM (2004): Parkin-associated Parkinson's disease. *Cell Tissue Res*, 318, 175-184
- Wang M, Pickart CM (2005): Different HECT domain ubiquitin ligases employ distinct mechanisms of polyubiquitin chain synthesis. *EMBO J*, 24, 4324-4333
- Weintraub D, Comella CL, Horn S (2008): Parkinson's disease-Part 1: Pathophysiology, symptoms, burden, diagnosis, and assessment. *Am J Manag Care*, 14, 40-48
- West A, Periquet M, Lincoln S, Lücking CB, Nicholl D, Bonifati V, Rawal N, Gasser T, Lohmann E, Deleuze JF, et al. (2002): Complex relationship between Parkin mutations and Parkinson disease. *Am J Med Genet*, 114, 584-591
- Winklhofer KF, Henn IH, Kay-Jackson PC, Heller U, Tatzelt J (2003): Inactivation of parkin by oxidative stress and C-terminal truncations: a protective role of molecular chaperones. *J Biol Chem*, 278, 47199-47208
- Winner B, Jappelli R, Maji SK, Desplats PA, Boyer L, Aigner S, Hetzer C, Loher T, Vilar M, Campioni S, et al. (2011): In vivo demonstration that {alpha}-synuclein oligomers are toxic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 4194-4199
- Xiong H, Wang D, Chen L, Choo YS, Ma H, Tang C, Xia K, Jiang W, Ronai Z, Zhuang X, Zhang Z (2009): Parkin, PINK1, and DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest*, 119, 650-660
- Xiomerisiou G, Dardiotis E, Tsimourto V, Kounta PM, Paterakis KN, Kapsalaki EZ, Fountas KN, Hadjigeorgiou GM (2010): Genetic basis of Parkinson disease. *Neurosurg Focus*, 28, 1-7
- Yang X, Chernenko G, Hao Y, Ding Z, Pater MM, Pater A and Tang SC (1998): Human BAG-1/RAP46 protein is generated as four isoforms by alternative translation initiation and overexpressed in cancer cells. *Oncogene*, 17, 981-989
- Yang Y, Nishimura I, Imai Y, Takahashi, Lu B (2003): Parkin suppresses dopaminergic neuron-selective neurotoxicity induced by Pael-R in *Drosophila*. *Neuron*, 37, 911-924
- Zeiner M, Niyaz Y, Gehring U (1999): The hsp70-associating protein Hap46 binds to DNA and stimulates transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 10194-10199
- Zhang Y, Gao J, Chung KK, Huang H, Dawson VL, Dawson TM (2000): Parkin functions as an E2-dependent ubiquitin- protein ligase and promotes the degradation of the synaptic vesicle-associated protein, CDCrel-1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 13354-13359
- Zhong L, Tan Y, Zhou A, Yu Q, Zhou J (2005): RING finger ubiquitin-protein isopeptide ligase Nrdp1/FLRF regulates parkin stability and activity. *J Biol Chem*, 280, 9425-9430

7 Veröffentlichung zum Thema der Dissertation

Teile der vorliegenden Dissertation wurden in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

Poster:

Schuenemann J, Deeg S, Kermer P: Modulation of Parkin enzyme activity by BAG1. 84. Kongress der deutschen Gesellschaft für Neurologie. 28. September bis 1. Oktober 2011 in Wiesbaden

Sieger des Posterpreises in der Kategorie Neurogenetik

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Prof. Dr. Mathias Bähr bedanken für die Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe zu arbeiten und mich so an der Erforschung neurodegenerativer Erkrankungen zu beteiligen.

Meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Pawel Kermer möchte ich herzlich danken für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die Bereitstellung des interessanten Themas sowie die immerwährende Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Dr. med. Sebastian Deeg für die exzellente Einführung in die Techniken der praktischen Laborarbeit, seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen Schwierigkeiten während meiner gesamten Dissertation.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Bähr danke ich für die fachliche und hilfsbereite Unterstützung während meiner Arbeit. Besonders hervorheben möchte ich dabei die medizinisch-technischen Assistentinnen Sandra Gerke und Beate Veith. Danke für eure geduldige und exzellente Unterstützung.

Auch Barbara Müller, Katrin Eckermann, Christine Poser, Anja Büchner und Prof. Dr. Uwe Michel möchte ich herzlich danken.

Prof. Dr. Ted Dawson von der Johns Hopkins University in Baltimore danke ich herzlich für die Bereitstellung der CDCrel-1-Plasmide.